

# **Evolution glöxinabhängiger interzellulärer Kommunikation in sozialen Amöben**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)



**FRIEDRICH-SCHILLER-  
UNIVERSITÄT  
JENA**

vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M. Sc. Daniel Heinrich geb. Raszkowski

geboren am 15.12.1980 in Weißenfels

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Winckler (Jena)
2. Dr. Pierre Stallforth (Jena)
3. Prof. Dr. Rupert Mutzel (Berlin)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 29.10.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XVI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XVII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Taxonomie und Phylogenie der Dictyosteliden .....	2
1.2 Dauerstadien der Dictyosteliden bei ungünstigen Umweltbedingungen .....	3
1.3 Die Kommunikation während der Aggregation bei <i>D. discoideum</i> .....	6
1.4 Die Acrasine der sozialen Amöben.....	8
1.5 Das Acrasin Glorin .....	9
1.6 Das Forschungsobjekt soziale Amöbe.....	11
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	13
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1 Material.....	14
2.1.1 Chemikalien.....	14
2.1.2 Stammlösungen.....	14
2.1.3 Kulturmedien und Platten .....	15
2.1.4 Pufferlösungen .....	15
2.1.5 Oligonukleotide.....	20
2.1.6 Plasmide und Mikroorganismen .....	21
2.2 Zellkultivierung .....	22
2.2.1 Bakterien .....	22
2.2.2 <i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 .....	22
2.2.3 <i>Polysphondylium pallidum</i> PN500 und andere Dictyosteliden .....	22
2.2.4 Herstellung glorinasehaltiger Überstände und Amöben .....	22

2.2.5	Pulsexperimente mit Glorin und seinem Metaboliten .....	23
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	23
2.3.1	Transformation von Bakterien und Dictyosteliden .....	23
2.3.2	Klonierung.....	24
2.3.3	Plasmidisolation aus <i>E. coli</i> .....	25
2.3.4	DNA-Sequenzierung.....	25
2.3.5	RNA-Isolierung.....	26
2.3.6	cDNA-Synthese.....	26
2.4	Proteinbiochemische Methoden .....	26
2.4.1	Genexpression .....	26
2.4.2	Zellernte und Zelllyse .....	26
2.4.3	Proteinreinigung.....	26
2.4.4	Proteinfraktionierung.....	27
2.5	Analytische Methoden.....	28
2.5.1	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration .....	28
2.5.2	SDS-PAGE, Western-Blot und Immunodetektion .....	28
2.5.3	Zellzahl-Bestimmung.....	29
2.5.4	Chemotaxis-Assay .....	29
2.5.5	Glorinase-Assay .....	30
2.5.6	RT-qPCR.....	30
2.5.7	HPLC-UV .....	30
2.5.8	HPLC mit hochauflösender Massenspektrometrie (HR/MS) .....	30
2.5.9	Verdau von Proteinen und MALDI-TOF .....	31
2.6	Photometrischer $\gamma$ -GT-Aktivitätstest.....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1	Etablierung eines Glorinase-Assays.....	32



3.1.1	Analytik von Glorin.....	32
3.1.2	Temperaturstabilität von Glorin .....	34
3.1.3	pH-Stabilität von Glorin.....	35
3.2	Glorinaseaktivität in hungernden <i>Polysphondylium pallidum</i> Zellen .....	37
3.2.1	Sekretierte Glorinaseaktivität.....	37
3.2.2	Zellgebundene und sekretierte Glorinaseaktivität während der Entwicklung 39	
3.2.3	Zellgebundene Glorinaseaktivität in vegetativen Zellen.....	41
3.2.4	Metabolitenspektrum bei Langzeit-Glorinase-Assay .....	42
3.2.5	Identifizierung von Glorin-Metaboliten.....	43
3.3	Biologische Aktivität von M1 und Glorinamid.....	48
3.3.1	Expression von glorininduzierten Markergenen.....	48
3.3.2	Chemotaxis-Assay mit Glorin und M1 .....	50
3.4	Temperaturoptimum und Inhibition der Glorinase.....	52
3.4.1	Temperaturoptimum der löslichen Glorinaseaktivität .....	52
3.4.2	Inhibition der Glorinase durch Lactamringanaloga und Glorinamid.....	53
3.4.3	Inhibition der Glorinase durch Proteaseinhibitoren.....	56
3.5	Revidiertes Metabolismusmodell von Glorin.....	58
3.6	Glorinaseaktivität in anderen Dictyosteliden .....	58
3.7	Sekretom von <i>Polysphondylium pallidum</i> .....	60
3.8	Fraktionierung von glorinasehaltigen Überständen .....	62
3.8.1	Concanavalin-A-Chromatographie .....	62
3.8.2	Ultrafiltration mit VivaSpin Turbo .....	66
3.8.3	Größenausschlusschromatographie.....	67
3.8.4	Anionenaustauschchromatographie.....	71
3.9	Proteomische Analyse der Fraktionierung des Überstandes .....	76
3.10	Bioinformatische Charakterisierung der Glorinasekandidaten .....	78

3.11	Expression und Aktivität der Glorinasekandidaten .....	81
3.11.1	Expression von <i>PPA_G1385236</i> in <i>Escherichia coli</i> .....	81
3.11.2	Expression von <i>PPA_G1286130</i> in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	87
3.11.3	Expression von <i>PPA_G1374042</i> ( <i>PPL_11291</i> ) in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	88
3.11.4	Expression in <i>Dictyostelium discoideum</i> AX2.....	89
3.11.5	Glorinaseaktivität von gereinigtem rekombinanten <i>PPA_G1385236</i> .....	91
3.12	Biosynthese von Glorin .....	93
3.12.1	Identifizierung und bioinformatische Charakterisierung von $\gamma$ -GTs in <i>P. pallidum</i> .....	94
3.12.2	Expression und Reinigung der $\gamma$ -GT <i>PPA_G1318746</i> .....	97
3.12.3	Photometrischer $\gamma$ -GT-Aktivitätstest .....	98
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>101</b>
4.1	Etablierung eines Glorinase-Assays.....	101
4.2	Identifizierung und biologische Aktivität des Glorinmetaboliten.....	102
4.3	Glorinaseaktivität in hungernden und vegetativen Zellen .....	104
4.4	Suche nach einem Inhibitor der Glorinase und des sekretierten Glorins .....	105
4.5	Das Sekretom, aktivitätsgeleitete Fraktionierung und Proteomics .....	107
4.6	Heterologe Expression von Genen die für sekretierte und cytosolische Proteine von <i>Polysphondylium pallidum</i> kodieren .....	109
4.7	Glorinbiosynthese.....	111
4.8	Der Glutathionzyklus in den sozialen Amöben? .....	112
4.9	Glorinbasierte versus cAMP-basierte Zell-Zell-Kommunikation .....	114
4.10	Ursprung der glorinbasierten Aggregation im letzten gemeinsamen Vorfahren der sozialen Amöben.....	115
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>119</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>121</b>

---

<b>Anhang.....</b>	<b>130</b>
<b>Liste der wissenschaftlichen Publikationen .....</b>	<b>133</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>134</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>135</b>

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Klassifikation der Eukaryoten. Die Dictyosteliden gehören zu der Gruppe der Amoebozoa. Die Abkürzung SAR setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der enthaltenen Organismusgruppen Stramenopile, Alveolata und Rhizaria zusammen [3]..... 1
- Abbildung 2:** Phylogenie der Dictyosteliden. Der phylogenetische Stammbaum wurde berechnet durch den Vergleich von 47 aneinandergelegten Proteinen der untersuchten Arten. Die Wahrscheinlichkeit war 1.0 für alle Nodi [13]..... 3
- Abbildung 3:** Dauerformen der sozialen Amöben hier am Beispiel von *Polysphondylium pallidum*. Die Amöbe kann bei ungünstigen Umweltbedingungen (hohe Osmoralität, Nahrungsmangel usw.) eine Mikrozyste, eine Makrozyste oder einen Fruchtkörper ausbilden. Die Mikrozyste entsteht aus einer einzelnen Amöbe. Die Makrozyste und der Fruchtkörper bilden sich aus einer Vielzahl von Amöben. Abbildung modifiziert nach [16]. ..... 4
- Abbildung 4:** Der multizelluläre Zyklus am Beispiel von *Dictyostelium discoideum*. Abbildung modifiziert nach [27]..... 5
- Abbildung 5:** A: cAMP-Welle in einer Amöbenpopulation. Die Gründerzelle startet die cAMP-Sekretion. Die umliegenden Amöben empfangen das cAMP-Signal und sekretieren weiteres cAMP. Dabei reagieren die Amöben auch chemotaktisch auf den cAMP-Gradienten und bewegen sich auf die Amöbe zu. So wird das cAMP-Signal in der Population weitergegeben. Nach 6-7 min startet die Gründerzelle eine weitere cAMP-Welle (cAMP-Oszillator). B: Beteiligte Komponenten des cAMP-Oszillators. CAR1 cAMP-Rezeptor, ACA Adenylylcyclase A, AbcB3 cAMP-Transporter, RegA und PdsA Phosphodiesterasen, ERK2 Proteinkinase, PKA Proteinkinase A (C katalytische Untereinheit und R regulatorische Untereinheit). Blaue Pfeile: aktivierende Wirkung, Blauer Strich: hemmende Wirkung. Abbildung modifiziert nach [22, 33, 35]..... 7
- Abbildung 6:** Struktur von *N*-Propionyl- $\gamma$ -L-glutamyl-L-ornithin- $\delta$ -lactamethylester (Glorin). Glorin ist ein ungewöhnliches Dipeptid aus Glutamat und Ornithin- $\delta$ -lactam. Die Carbonsäure ist mit Ethanol und die Aminogruppe ist mit Propionsäure blockiert [45]. ..... 9
- Abbildung 7:** Metabolismusmodell von Glorin durch *P. violaceum* nach De Wit et al. [48]. Postuliert werden zwei enzymatische Aktivitäten zum Abbau von Glorin. Das aktivere Enzym hydrolysiert den Lactamring im Glorin und es entsteht Verbindung V2. Da V2 keine biologische Aktivität besaß, nannte De Wit dieses Enzym Glorinase. Er fand noch eine schwächere enzymatische Aktivität. Bei dieser wird vom Glorin die Propionsäure abgespalten und es entsteht Verbindung V3..... 10
- Abbildung 8:** Chromatogramme von 30 (A), 150 (B), 300 (C) und 450  $\mu$ M (D) Glorin. Es wurden jeweils 20  $\mu$ L Lösung injiziert. Glorin elutierte bei einer RT von 8,1 min. .... 33
- Abbildung 9:** Massenspektrum von Glorin. .... 33

**Abbildung 10:** Chromatogramme der Bestimmung der Temperaturstabilität von Glorin in 17 mM Phosphat-puffer pH-Wert 6,2 bei 25 °C (blau) und 95 °C (rot) für 10 min. .. 34

**Abbildung 11:** Chromatogramme der Stabilitätsuntersuchungen von Glorin bei pH-Werten von 5-9 bei 22 °C. Verwendete Puffer waren beim pH-Wert 5 50 mM Acetatpuffer, beim pH-Wert 6 17 mM Phosphatpuffer, beim pH-Wert 7 17 mM Phosphatpuffer, beim pH-Wert 8 20 mM Tris-Puffer und beim pH-Wert 9 20 mM Tris-Puffer. Nach 0 (blau), 4 (rot) und 24 h (grün) wurden Proben entnommen und 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die HPLC-Analyse. Bei den gezeigten Chromatogrammen handelt es sich um repräsentative Chromatogramme aus einer parallel durchgeführten Dreifachbestimmung..... 36

**Abbildung 12:** Chromatogramme der Glorindegradation durch enzymatische Aktivität im Überstand von hungrigen *P. pallidum* Zellen. Die Zellen wurden in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 bei 100 rpm und 22 °C inkubiert. Nach 1 h wurde der Überstand entnommen und 300 µM Glorin wurde zugesetzt und bei 22 °C inkubiert. Die Reaktionszeit betrug bei A 0 min, bei B 30 min, bei C 60 min und bei D 100 min. Glorin wurde innerhalb von 100 min zu einem detektierbaren Metaboliten (M1) abgebaut..... 38

**Abbildung 13:** Glorindegradation durch enzymatische Aktivität im Überstand von hungrigen *P. pallidum* Zellen. Die Zellen wurden in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 bei 100 rpm und 22 °C inkubiert. Nach 1 h wurde der Überstand entnommen 300 µM Glorin wurde zugesetzt und bei 22 °C inkubiert. Nach den angegebenen Reaktionszeiten wurde die Reaktion durch Inkubation bei 95 °C für 10 min gestoppt. Glorin wurde von der Enzymaktivität im Überstand innerhalb von 100 min zu 92,9 % abgebaut..... 39

**Abbildung 14:** Sekretierte und zellgebundene Glorinaseaktivität von *P. pallidum* während einer Hungerperiode bis 8 h in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 bei 22 °C und 100 rpm. Die Zellen wurden per Zentrifugation (300 g, 5 min) vom Überstand getrennt und im Ausgangsvolumen mit 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 resuspendiert. Der Überstand wurde zusätzlich zur Zentrifugation filtriert (0,45 µm). Der Glorinase-Assay erfolgte direkt nach der Probenentnahme (22 °C, 30 min). Das Experiment fand zweimal mit ähnlichen Ergebnissen statt..... 40

**Abbildung 15:** Glorinaseaktivität in vegetativen Zellen. Eine Fraktion von *Polysphondylium pallidum* wurde direkt nach der Ernte ohne Waschschrift auf einen Titer von  $2 \cdot 10^7$  Zellen/mL eingestellt, um unmittelbar den Glorinase-Assay durchzuführen. Die andere Fraktion wurde klassisch gewaschen und in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 auf einen Titer von  $2 \cdot 10^7$  Zellen/mL eingestellt. Nach 30 und 60 min der Ernte wurden Zellen entnommen und ein Glorinase-Assay durchgeführt. Die angegebenen Werte entsprechen Einfach-Messungen. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt..... 41

- Abbildung 16:** Glorinase-Assay mit Überstand von *P. pallidum* nach einer Hungerperiode von 4 h. Der Überstand wurde mit 600  $\mu$ M Glorin versetzt und bei 22 °C mit den angegebenen Zeiten inkubiert.  $RT_{\text{Glorin}} = 7,7$  min,  $RT_{M1} = 5,3$ ,  $RT_{M2} = 3,4$  min..... 42
- Abbildung 17:** Massenspektrum des Metaboliten M1 und die ermittelte Struktur zu dem  $[M+H]^+$  von 300,1552..... 43
- Abbildung 18:** Massenspektrum des Metaboliten M2 und die ermittelte Struktur zu dem  $[M+H]^+$  von 244,1290..... 44
- Abbildung 19:** HPLC-Analyse des gereinigten Metaboliten M1. M1 wurde enzymatisch durch Inkubation von Glorin mit Überstand von *P. pallidum* und chemisch durch Verseifung von Glorin hergestellt. Beide Verbindungen wurden mittels präparativer C18-HPLC aufgereinigt. Dann wurden die Retentionszeiten dieser Verbindungen auf einer analytischen C18-HPLC bestimmt.  $RT_{\text{enzymatisch}} = 5,1$  min,  $RT_{\text{chemisch}} = 5,1$  min... 45
- Abbildung 20:** HPLC-Analyse der Temperaturstabilität von M1. 200  $\mu$ L einer M1-Lösung wurden zu zwei Teilen gesplittet. Der eine Teil wurde 10 min bei 25 °C und der andere Teil 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf einer analytischen C18-HPLC analysiert..... 45
- Abbildung 21:** Struktur von Glorinamid und Glorin..... 47
- Abbildung 22:** Glorinase-Assay mit Glorinamid (A) oder Glorin (B) als Substrat. Wegen der Löslichkeit von Glorinamid wurden alle Reaktionsansätze zusätzlich mit 2 % DMSO versetzt. Glorin wurde klassisch abgebaut. Glorinamid war innerhalb von 5 h Reaktionszeit stabil gegenüber dem enzymatischen Abbau..... 47
- Abbildung 23:** RT-qPCR zweier glorininduzierter Gene nachdem hungernde Zellen von *P. pallidum* mit 2x Wasser, 1  $\mu$ M Glorin oder 1  $\mu$ M M1 gepulst wurden. Angegeben ist der Fold Change: Genexpression (mRNA) von hungernden Zellen gegen vegetative Zellen. Die angegebenen Daten sind MW+SD aus 8 biologischen Replikaten. Studentverteilung gegen Zellen mit Wasser gepulst: +  $p > 0,05$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .... 49
- Abbildung 24:** RT-qPCR des glorininduzierten Gens *PPL\_09347*, nachdem hungernde Zellen von *P. pallidum* mit 2x Wasser, Glorin oder Glorinamid gepulst wurden. Angegeben ist der Fold Change: Genexpression (mRNA) von hungernden Zellen gegen vegetative Zellen. Die angegebenen Daten sind MW+SA aus 3 biologischen Replikaten. Studentverteilung gegen Zellen mit Wasser gepulst: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ..... 50
- Abbildung 25:** Foto von der Insall-Chamber. Das große Quadrat zeigt die Position des Deckgläschens mit Zellen auf der Unterseite. Die Pfeile markieren den Kanal für die Chemoattraktantlösung. In der Mitte befindet sich ein Pufferreservoir. Zwischen Pufferreservoir und Kanal bildet sich ein stabiler Gradient von der in der Chemoattraktantlösung enthaltenen Verbindung aus. Die roten Rechtecke zeigen den Beobachtungsbereich. Abbildung modifiziert nach [78]..... 51
- Abbildung 26:** Rose Plot des Insall-Chamber-Assays von *P. pallidum* mit einem

Gradienten von 0-100 nM von Glorin oder M1. Bei Glorin gab es eine gerichtete Bewegung der Zellen in Richtung der größeren Glorinkonzentration. Bei M1 erfolgte keine gerichtete Bewegung der Zellen und somit war M1 chemotaktisch inaktiv. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.....	51
<b>Abbildung 27:</b> Bestimmung des Temperaturoptimums der Glorinase. Der Glorinase-Assay fand bei den angegebenen Temperaturen für 30 min statt. Danach erfolgte eine Hitzeinaktivierung bei 95 °C für 10 min. ....	52
<b>Abbildung 28:</b> Strukturen von S-3-Aminopiperidin, S-3-Amino-2-piperidon, 2-Aminocyclohexanon .....	53
<b>Abbildung 29:</b> Inhibition der sekretierten Glorinase durch S-(+)-3-Aminopiperidin, S-3-Amino-2-piperidon und 2-Aminocyclohexanon. Es wurden 300 µM Glorin als Substrat eingesetzt. Die Inhibitoren wurden mit 0,3 mM (1:1), 1,5 mM (5:1) und 3 mM (10:1) eingesetzt. Der Überstand wurde vor der Zugabe von Glorin 5 min mit dem vermuteten Inhibitor bei 22 °C inkubiert. Die Reaktionszeit betrug 30 min. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SA eines Experiments, welches als jeweilige Dreifachbestimmung parallel durchgeführt wurde. ....	54
<b>Abbildung 30:</b> Inhibition der sekretierten Glorinase durch Glorinamid. Es wurden 0,3 mM Glorin als Substrat genutzt. Glorinamid als möglicher Inhibitor wurde mit 0 (ohne Inhibitor), 0,3 mM (1:1), 1,5 mM (5:1) und 3 mM (10:1) eingesetzt. Der Überstand wurde vor Zugabe von Glorin 5 min mit Glorinamid bei 22 °C inkubiert. Die Reaktionszeit betrug 30 min. Die gezeigten Daten sind Einzelwerte eines Experiments.....	55
<b>Abbildung 31:</b> Hemmung der Glorinaseaktivität durch Proteaseinhibitoren. Der Umsatz der Proben wurde auf die Kontrolle bezogen.....	57
<b>Abbildung 32:</b> Metabolismus von Glorin durch <i>Polysphondylium pallidum</i> . Glorin wurde durch hydrolytische Abspaltung von Ethanol zu M1. M1 wurde bei längeren Reaktionszeiten durch hydrolytische Abspaltung von Propionsäure zu M2 abgebaut. Die Metaboliten M3 und M4 wurden von De Wit als Degradationsprodukte von Glorin postuliert [48]. ....	58
<b>Abbildung 33:</b> Vergleich des Glorinmetabolismus in Dictyosteliden. Es wurden Vertreter der phylogenetischen Gruppen 1-3 der sozialen Amöben ausgewählt. Die Amöben wurden auf Bakterien kultiviert und nach der Ernte für 1-4 h in 17 mM Phosphatpuffer bei 100 rpm und 22 °C inkubiert. Der zellfreie Überstand wurde mit 300 µM Glorin versetzt und 30 min bei 22 °V inkubiert. Die hitzeinaktivierten Proben wurden mittels HPLC analysiert. ....	59
<b>Abbildung 34:</b> 12,5 % SDS-Gel von 40-100 µg Gesamtprotein einer 4 h-Schüttelkultur von <i>P. pallidum</i> . Bande 1-14 wurden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und per MALDI-TOF analysiert. ....	60

- Abbildung 35:** Glorinaseaktivität von mit Con A fraktioniertem Überstand von *P. pallidum*. PA: Probenauftrag, DF: ungebundene Fraktion, Elution erfolgte mit 500 mM Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid in Bindepuffer, Reäqui.: Reäquilibrieren mit Bindepuffer..... 63
- Abbildung 36:** Silbergefärbtes SDS-Gel von mit Con A fraktioniertem Überstand von *P. pallidum*. Es wurden 75  $\mu$ L von jeder Fraktion aufgetragen. M: Marker, PA: Probenauftrag, DF: ungebundene Fraktion, Elution erfolgte mit 500 mM Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid in Bindepuffer, Reäqui.: Reäquilibrieren mit Bindepuffer ..... 64
- Abbildung 37:** Glorinaseaktivität von mit Con A fraktioniertem Überstand von *P. pallidum*. PA: Probenauftrag, DF: ungebundene Fraktion, 0-500 Konzentration von Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid im Elutionspuffer..... 65
- Abbildung 38:** Silbergefärbtes SDS-Gel von mit Con A fraktioniertem Überstand von *P. pallidum*. Es wurden 75  $\mu$ L von jeder Fraktion aufgetragen. M: Marker, PA: Probenauftrag, DF: ungebundene Fraktion, 0-500 mM Konzentration von Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid im Elutionspuffer. .... 66
- Abbildung 39:** Glorinumsatz im Glorinase-Assay von Retentat und Filtrat nach Zentrifugation von Überstand von *P. pallidum*. Die angegebenen Molekulargrößen 30-100 kDa entsprechen dem MWCO der Ultrafiltrationsmembran ..... 67
- Abbildung 40:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von Überstand von *P. pallidum*. 56 mL Überstand wurden mit einer Vivaspin® Turbo 15 (MWCO 10 kDa) auf 1,5 mL konzentriert und davon wurden 500  $\mu$ L auf eine Superdex 200 Increase 10/300 GL injiziert und mit 0,5 mL/min eluiert. Es wurden alle 2 mL eine neue Fraktion aufgefangen. Die Massen wurden mit einer Kalibriergeraden berechnet. .... 68
- Abbildung 41:** Glorinumsatz der durch Größenausschlusschromatographie gesammelten Fraktionen von Überstand von *Polysphondylium pallidum*. PA nicht fraktionierter Überstand..... 69
- Abbildung 42:** Silbergefärbtes SDS-Gel der Fraktionen 5-10 von der Größenausschlusschromatographie von Überstand von *P. pallidum*. M: Marker, PA: nicht fraktionierter Überstand ..... 70
- Abbildung 43:** Chromatogramm (blaue Linie) der Fraktionierung von Überstand von *Polysphondylium pallidum* mittels Anionenaustauschchromatographie. Die Elution erfolgte mit 1 M NaCl im Eluent B (20 mM Tris/HCl pH 7,5). Rote Linie Anteil: von Eluent B im Laufpuffer..... 72
- Abbildung 44:** Glorinumsatz der mittels Anionenaustauschchromatographie gesammelten Fraktionen von 3,5 mL Überstand von *P. pallidum*. A: Fraktionen pur (90  $\mu$ L Fraktion + 10  $\mu$ L Glorinstammlösung) im Glorinase-Assay eingesetzt. PA: nicht fraktionierter Überstand, DF: nicht gebundene Fraktion, wa: Waschfraktion, 1-30 Fraktionen während des Salzgradienten. B: Fraktionen vor Glorinase-Assay 10-fach verdünnt (9  $\mu$ L Fraktion + 81  $\mu$ L 17 mM Phosphatpuffer + 10  $\mu$ L Glorinstammlösung)



- ..... 73
- Abbildung 45:** Silbergefärbtes SDS-Gel der Fraktionierung von 3,5 mL Überstand von *P. pallidum* mittels Anionenaustauschchromatographie. 75 µL wurden von jeder Fraktion aufgetragen. M: Marker, PA: nicht fraktionierter Überstand. Blaue Rechtecke: Banden, deren Intensitätsverlauf mit dem Verlauf der Glorinaseaktivität aus Abbildung 44 korreliert. .... 74
- Abbildung 46:** Glorinumsatz der mittels Anionenaustauschchromatographie gesammelten Fraktionen von 200 mL Überstand von *P. pallidum*. Die Fraktionen wurden vor dem Glorinase-Assay zehnfach mit 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 verdünnt (9 µL Fraktion + 81 µL Puffer). .... 75
- Abbildung 47:** Silbergefärbtes SDS-Gel der Fraktionierung von 200 mL Überstand von *P. pallidum* mittels Anionenaustauschchromatographie. PA entspricht 45 µg Gesamtprotein. Ansonsten wurden 200 µL von jeder Fraktion lyophilisiert in, 100 µL 1xSDS-Probenpuffer resuspendiert und auf das Gel aufgetragen. M: Marker, PA: nicht fraktionierter Überstand. Blaue Rechtecke: Banden, deren Intensitätsverlauf mit dem Verlauf der Glorinaseaktivität aus Abbildung 46 korreliert. .... 75
- Abbildung 48:** Primärsequenz des Glorinasekandidaten PPA\_G1385236. Grün: Signalsequenz M1-A23, blau: Cystein, rot: katalytische Triade S213, E336, H446. Die Signalsequenz wurde durch Analyse mit SignalP 4.1 identifiziert. Ein Sequenzalignment mit der humanen Butyrylcholinesterase (UniProt P06276) ermittelte die katalytische Triade (siehe Abbildung 49). .... 79
- Abbildung 49:** Sequenzalignment von PPA\_G1385236 mit den homologen Sequenzen von der sozialen Amöben, *A. castellanii*, *Xenophilus azovorans*, *Oryzias melastigma* mit einer Übereinstimmung bis minimal 32 % und der humanen Butyrylcholinesterase (P06276) 30 %. Mit diesem Alignment konnte die katalytische Triade S213, E336 und H446 bestimmt werden. Das Alignment wurde mit MultAlin erstellt. Rot Konsensus mind. 90 %, blau Konsensus mind. 50 % [72]. .... 80
- Abbildung 50:** Schematische Darstellung des Konstruktes für den Glorinasekandidaten PPA\_G1385236 zur Expression in *E. coli*. Ein His<sub>6</sub>-Tag wurde N-terminal an die AS 24 von PPA\_G1385236 fusioniert. .... 81
- Abbildung 51:** Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von PPA\_G1385236 in *E. coli* BL21 (DE3). Die transformierten Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression erfolgte bei A 22 °C, B 30 °C, C 37 °C und 140 rpm und wurde durch Zugabe von 0,1 mM IPTG gestartet. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert. Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Es bildete sich ein Protein unterhalb der Laufhöhe von 55 kDa gebildet (schwarze Pfeile). Bei keinem Expressionsansatz konnte lösliches PPA\_G1385236 detektiert werden. .... 82

**Abbildung 52:** Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von *PPA\_G1385236* in *E. coli* BL21 (DE3). Die transformierten Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression fand bei 22 °C und 140 rpm statt und startete durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h (A) bzw. 22 h (B) Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert. Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Es bildete sich ein Protein, welches unterhalb der Laufhöhe von ca. 55 kDa lief (schwarze Pfeile). Bei keinem Expressionsansatz konnte lösliches *PPA\_G1385236* detektiert werden..... 83

**Abbildung 53:** Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von *PPA\_G1385236* in *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta und Tuner. [A] Vor Induktion -IPTG und Ernte +IPTG. [B] lösliche (lös.) und unlösliche (unlös.) Proteinfraction. Die transformierten Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression fand bei 22 °C und 140 rpm statt und startete durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert. Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Es bildete sich ein Protein, welches eine Laufhöhe unter 55 kDa hat (schwarze Pfeile). Bei keinem Expressionsansatz ließ sich lösliches *PPA\_G1385236* detektieren. Die Abbildung wurde aus zwei SDS-Gelen zusammengesetzt, dabei wurden die Marker der beiden Gele aufeinander skaliert..... 84

**Abbildung 54:** Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von *PPA\_G1385236* in *E. coli* Origami 2. Die transformierten Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression fand bei 22 °C und 140 rpm statt und startete durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert. Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Es bildete sich ein Protein, welches eine Laufhöhe unter 55 kDa hat (schwarze Pfeile). Es konnte kein lösliches *PPA\_G1385236* detektiert werden..... 84

**Abbildung 55:** Schematische Darstellung der Fusionsproteine aus dem maltosebindendes Protein MBP aus *E. coli* (A), preMBP (B) und dem Glorinasekandidaten *PPA\_G1385236* zur Expression in *E. coli*. Bei MBP war die N-terminale Signalsequenz deletiert. Bei preMBP war die Signalsequenz intakt und führte nach der Expression zur Sekretion ins Periplasma von *E. coli*. Bei *PPA\_G1385236* wurde die N-terminale Signalsequenz deletiert..... 85

**Abbildung 56:** Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von MBP-PPA\_G1385236 (A) und preMBP-PPA\_G1385236 (B) in *E. coli* BL21 (DE3). Die transformierten Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression fand bei 22 °C und 140 rpm statt und startete durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert (MBP-PPA\_G1385236) oder mittels osmotischen Schocks laut MBP-Protokoll lysiert (preMBP-PPA\_G1385236). Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Es bildete sich jeweils ein Protein, welches eine Laufhöhe von ca. 100 kDa hat (schwarze Pfeile). Die Abbildung wurde aus zwei SDS-Gelen zusammengesetzt, dabei wurden die Marker der beiden Gele aufeinander skaliert... 86

**Abbildung 57:** Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von PPA\_G1286130 in *E. coli* BL21 (DE3). Die transformierten Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression fand bei 22 °C und 140 rpm statt und startete durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert. Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Ein Protein bildete sich, welches eine Laufhöhe unter 55 kDa hat (schwarze Pfeile). Es konnte kein lösliches PPA\_G1286130 detektiert werden. .... 87

**Abbildung 58:** Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von PPA\_G1374042 in *E. coli* BL21 (DE3). Die transformierten Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression fand bei 22 °C und 140 rpm statt und startete durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert. Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Ein Protein bildete sich, welches eine Laufhöhe unter 55 kDa hat (schwarze Pfeile). Es konnte keine lösliches PPA\_G1374042 detektiert werden. .... 88

**Abbildung 59:** Schematische Darstellung des Konstruktes für den Glorinasekandidaten PPA\_G1385236 zur Expression in *Dictyostelium discoideum* AX2. Es wurde das Protein mit intakter N-terminaler Signalsequenz und C-terminalem Flag-Tag für die Detektion produziert. .... 89

**Abbildung 60:** Expressionsanalyse mittels Western-Blot von PPA\_G1385236 in *D. discoideum* AX2. Die transformierten Zellen wurden in Petrischalen in HL5<sub>G418</sub> (A) oder 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 (B) bei 22 °C inkubiert. Das HL5<sub>G418</sub> oder der Phosphatpuffer wurde direkt mit Laemmli-Puffer versetzt und mittels SDS-PAGE/Western-Blot analysiert. Der Nachweis erfolgte mit einem gegen den C-terminalen Flag-Tag gerichteten Antikörper. .... 90

- Abbildung 61:** Western-Blot der Reinigung von PPA\_G1385236 (sekretiert in HL5) mittels Anionenaustauschchromatographie. Das proteinangereicherte HL5-Medium wurde mit einer Vivaspin Turbo® 15 (MWCO 10 kDa) auf 20 mM Tris/HCl pH 8,0 umgepuffert. Die Proteinlösung wurde auf eine HiTrap Canto Q CV 1 mL aufgetragen und mit 5 CV BP gewaschen, gefolgt von einem linearen Gradienten von 0-100 % EP (1 M NaCl) in 30 min. Während des Gradienten wurden 1 mL-Fractionen gesammelt. .... 91
- Abbildung 62:** Bestimmung der Glorinaseaktivität des gereinigten rekombinanten Glorinasekandidaten PPA\_G1385236. PPA\_G1385236 wurde in *D. discoideum* exprimiert und mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Der Glorinase-Assay erfolgte in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 22 °C für 1 h bzw. 2 h. Es konnte keine enzymatische Bildung von M1 beobachtet werden. .... 92
- Abbildung 63:** Vereinfachter  $\gamma$ -Glutamylzyklus (Glutathionzyklus). Abbildung modifiziert nach [87]. .... 93
- Abbildung 64:** Sequenzalignment der identifizierten  $\gamma$ -GT-Kandidaten aus *P. pallidum* und *D. fasciculatum* mit der Referenz- $\gamma$ -GT aus *E. coli* (UniProt P18956). Das Alignment wurde mit Clustal X [90] und mit BoxShade ([https://embnet.vital-it.ch/software/BOX\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html)) erstellt. .... 95
- Abbildung 65:** Phylogenetischer Stammbaum der ausgewählten Proteine der  $\gamma$ -GT, PPA aus *P. pallidum*, DFA aus *D. fasciculatum* und *E. coli* (P18956). Der Stammbaum wurde aus einem Alignment erstellt mit ClustalX nach dem Neighbor-Joining-Verfahren generiert. Gezeigt wird der optimale Baum mit einer Gesamtlänge von 2.67872054. Die Häufigkeit dieses Stammbaums wurde mit dem Bootstrap-Test bestimmt (1000 Wiederholungen) und findet sich neben den Nodi. .... 96
- Abbildung 66:** Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE des Gens  $\gamma$ -gt PPA\_G1318746 in *E. coli* BL21 (DE3). Die Pfeile zeigen die Laufhöhe der drei Spezies von PPA\_G1318746. 1.: unprozessiertes Protein 60,5 kDa, 2.: große Untereinheit 39,5 kDa und 3.: kleine Untereinheit 21 kDa .... 97
- Abbildung 67:** Elutionsfraktionen (250 mM Imidazol) der Aufreinigung der exprimierten  $\gamma$ -gt PPA\_G1318746. Die Reinigung erfolgte mittels Metallaffinitätschromatographie (nickelbeladene HiTrap Chelating HP CV 1 mL) über den N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag. Nach Probenaufruf, wurden die gebundenen Proteine gewaschen. Die Elution erfolgte durch 250 mM Imidazol im Bindepuffer. Alle drei Spezies der  $\gamma$ GT wurden in den Elutionsfraktionen detektiert. .... 98

- Abbildung 68:** Photometrischer Aktivitätstest der  $\gamma$ GT: Glutamyl-*p*-nitroanilid wird durch die  $\gamma$ -GT in Glutamat und *p*-Nitroanilin gespalten. Bei Anwesenheit eines Akzeptors (Substrat mit freier Aminogruppe) kommt es zur Bildung einer neuen Amidbindung zwischen dem Glutamylrest und der Aminogruppe des Akzeptors. Liegt kein geeignetes Substrat vor, findet eine Hydrolyse unter Bildung von Glutamat statt. *p*-Nitroanilin besitzt ein Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge von 410 nm, sodass die Reaktion mittels Vis-Spektroskopie analysiert werden konnte. Als Glutamylakzeptor dienten Glycylglycin, Ornithin, Ornithin- $\delta$ -lactam und als Negativkontrolle wurde kein Substrat zugesetzt. .... 99
- Abbildung 69:** Absorptionsverlauf der durch die  $\gamma$ GT katalysierten Reaktion von Glutamyl-*p*-nitroanilid mit Ornithin (blau), Ornithinlactam (rot), Glycylglycin (grün) oder ohne Akzeptor (lila). Gemessen wurde die Absorption des freien *p*-Nitroanilins bei 410 nm. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung eines Experiments, welches als jeweilige Dreifachbestimmung parallel durchgeführt wurde. .... 100
- Abbildung 70:** Reaktionsgleichung des möglichen photometrischen Glorinase-Assay 102
- Abbildung 71:** Glorin und dessen mögliche Metaboliten durch Hydrolyse. Durchgezogene Pfeile führen zu Metaboliten, die in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten. (Kopie von Abbildung 32). .... 102

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Hergestellte Stammlösungen deren Lösungsmittel und Konzentration .....	14
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Oligonukleotide deren Sequenz, Schmelztemperatur ( $T_M$ ) und Verwendung.....	20
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Plasmide, deren Eigenschaften und Wirt.....	21
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete <i>E. coli</i> und deren Eigenschaften.....	21
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Stämme und deren Stammnummer.....	22
<b>Tabelle 6:</b> Eingestellter pH-Wert und der verwendete Puffer .....	35
<b>Tabelle 7:</b> Proteaseinhibitoren, die auf ihre Eigenschaft die Glorinase, zu hemmen untersucht wurden, die verwendete Konzentration und die inhibierten Proteaseklassen.....	56
<b>Tabelle 8:</b> Identifizierte Proteine, ihr Molekulargewicht und vermutete Proteinfunktion .....	61
<b>Tabelle 9:</b> Identifizierte Proteine, deren Molekulargewicht und vermutete Proteinfunktion .....	76
<b>Tabelle 10:</b> Auswertung der proteomischen Analyse von Fraktion 14 und 15 aus der Fraktionierung von 200 mL Überstand von <i>P. pallidum</i> (Abbildung 46). Angegeben ist die Anzahl gefundener Proteine in den Fraktionen. Anreicherungsfaktor = Intensität Protein X in Fraktion 14 oder 15/Intensität Protein X in nicht-fraktioniertem Überstand.....	77
<b>Tabelle 11:</b> Die zwei identifizierten Carboxylesterasen aus der proteomischen Analyse der gesamten Fraktionen 14 und 15 aus der Fraktionierung von 200 mL Überstand von <i>Polysphondylium pallidum</i> , deren Anreicherungsfaktor (Intensität von Protein X in Fraktion Y/Intensität von Protein X in nicht-fraktioniertem Überstand) und Molekulargewicht.....	78

## Abkürzungsverzeichnis

AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Rinderserumalbumin
CAS	Chemical Abstract Service
ConA	Concanavalin A
CV	Säulenvolumen
DBS	Dicty Base Strain
DF	Durchfluss
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP-Puffer	Elektroporationspuffer bei Dictyosteliden
fwd	forward
G418	Geneticin
γ-GT	γ-Glutamyltranspeptidase
His <sub>6</sub> -Tag	N-terminale sechsfach Histidinsequenz
HP	Hungerphase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR/MS	High Resolution MS
IAA	Iodacetamid
IMAC	Immobilisierte Metallaaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kV	Kilovolt
lös.	lösliche Proteinfraction
M1	Metabolit 1

---

M2	Metabolit 2
mA	Milliampere
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MBP	Maltose-bindendes-Protein
min	Minute
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
MW	Molecular Weight
MWCO	Molecular weight cut off
m/z	Masse zu Ladungsverhältnisse
NaCl	Natriumchlorid
Ni-NTA	Nitrilotriacetat mit komplexierten Nickel
PA	Probenauftrag
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR	Reverse Transcriptase quantitative PCR
rev	reverse
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC-Medium	Super optimal broth with catabolic repression Medium
Strep	Streptomycin
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time Of Flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Spannung
UV	Ultra Violet
unlös.	unlösliche Proteinfraction
V	Volt oder Volumen
V 2-4	Verbindung 2-4
z.B.	zum Beispiel



# 1 Einleitung

Die sozialen Amöben oder auch Dictyosteliden sind weit verbreitete eukaryotische Bodenorganismen, die sich von Bakterien und Pilzsporen ernähren [1, 2]. Die Dictyosteliden gehören zu der Gruppe der Amoebozoa, die überwiegend aus einzelligen Amöben besteht (Abbildung 1) [3-5]. Bei den Dictyosteliden handelt es sich um einzellige Amöben, die bei Nahrungsmangel einen Entwicklungszyklus starten, an dessen Ende ein Fruchtkörper mit Sporen gebildet wird, die diese ungünstigen Bedingungen überdauern können. Die Dictyosteliden wurden als Erstes von Brefeld beschrieben. Von ihm stammt auch die Bezeichnung Dictyostelium. Dabei steht das griechische „dictio“ für Netz und „stelio“ bedeutet Turm. Aufgrund der ähnlichen Erscheinung des Fruchtkörpers wurden die Dictyosteliden anfangs den Myxomyzeten zugeordnet [6].

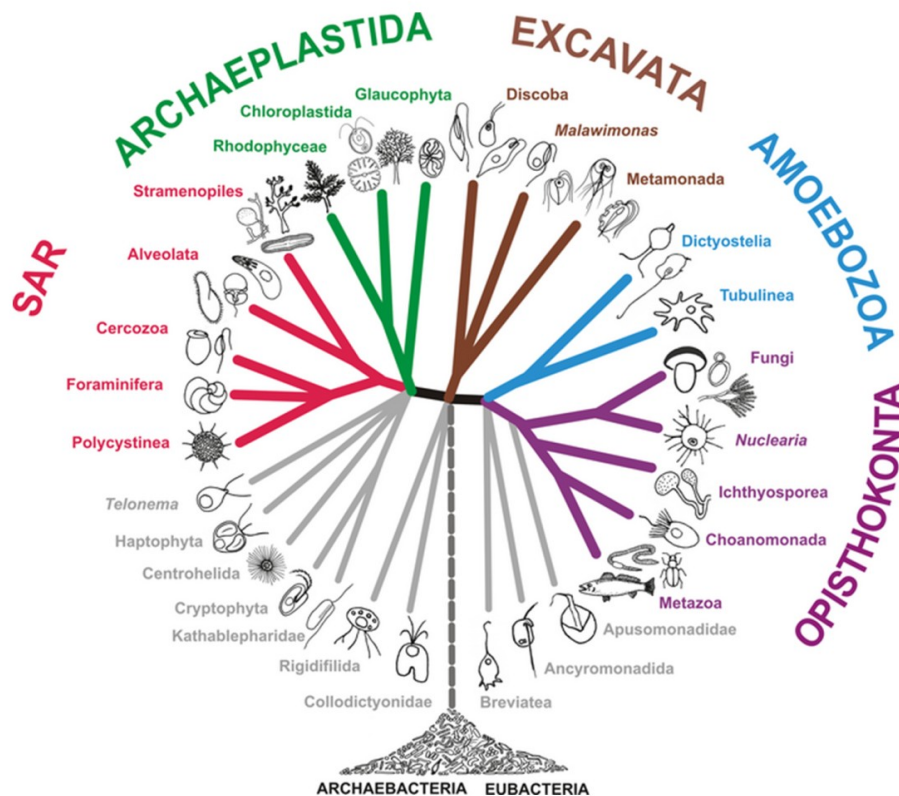


Abbildung 1: Klassifikation der Eukaryoten. Die Dictyosteliden gehören zu der Gruppe der Amoebozoa. Die Abkürzung SAR setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der enthaltenen Organismusgruppen Stramenopile, Alveolata und Rhizaria zusammen [3].

## 1.1 Taxonomie und Phylogenie der Dictyosteliden

Es sind ca. 150 Arten der Dictyosteliden bekannt, aber Baldauf konnte mit einer kultivierungsunabhängigen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) deutlich mehr soziale Amöben in Erdproben von verschiedenen Regionen der Erde auf molekularer Ebene nachweisen [7, 8]. Die vegetativen Amöben können nicht voneinander unterschieden werden, aber die Fruchtkörper zeigen deutliche Unterschiede. Aufgrund dessen wurden die sozialen Amöben in drei Genera aufgeteilt: *Dictyostelium*, *Acytostelium* und *Polysphondylium*. *Dictyostelium* bildet Fruchtkörper mit einem zellulären unverzweigten oder nur unregelmäßig verzweigten Stiel [6]. *Acytostelium* entwickelt Fruchtkörper mit einem azellulären Stiel [9]. Die Fruchtkörper von *Polysphondylium* bestehen aus einem zellulären regelmäßig verzweigten Stiel mit mehreren seitlichen Ästen [2]. Swanson fand Hinweise darauf, dass die Einteilung der sozialen Amöben nach der Morphologie des Fruchtkörpers die Verwandtschaftsbeziehungen nicht korrekt wiedergibt [10]. Diese Hypothese konnte durch Schaap et al. bestätigt werden [11]. Sie ermittelten den ersten phylogenetischen Stammbaum basierend auf SSU rDNA (kleine Untereinheit der ribosomalen RNA) und  $\alpha$ -Tubulin von mehr als 100 Spezies der Dictyosteliden. Danach können die Dictyosteliden in vier Gruppen aufgeteilt werden. Gruppe 1 beinhaltet *Dictyostelium*-Arten mit kleinen Fruchtkörpern. Gruppe 2 enthält alle nicht gefärbten *Polysphondylium*-, zwei *Dictyostelium*- und alle *Acytostelium*-Arten. Zu Gruppe 3 gehören *Dictyostelium*-Arten einschließlich der kannibalistischen Art *Dictyostelium caveatum*. Die Gruppe 4 ist die größte Gruppe und umfasst alle „modernen“ *Dictyostelium*-Arten (Fruchtkörper mit großen Sporenköpfen) einschließlich des Modellorganismus *D. discoideum*. *P. violaceum* und *D. laterosoum* bilden Fruchtkörper mit violetten Sporenköpfen und stellen eine Außengruppe zur Gruppe 4 dar. Des Weiteren schienen die Gruppen 1 und 2 die phylogenetisch ältesten Vertreter der Dictyosteliden zu sein [11]. Diese Annahme wurde von Sheikh et al. und Singh et al. widerlegt. Sie berechneten phylogenetische Stammbäume basierend auf Proteinsequenzen von sechs bzw. 14 Dictyosteliden, deren Genom sequenziert wurde. Danach entwickelten sich die Gruppen 1 und 2 paraphyletisch zu den Gruppen 3 und 4 [12, 13]. Singh et al. konnten den Stammbaum weiter auflösen und aktuell können die untersuchten Dictyosteliden in acht größere und kleinere Gruppen aufgeteilt werden [13]. Schilde et al. konnten die speziesreiche Gruppe 4 weiter auflösen und zeigten dass sich die Gruppe 4 in 5 Untergruppen (4A-E) aufspaltet [14]. Bei allen Berechnungen ergab sich, dass die

Gesamtheit der Dictyosteliden eine monophyletische Gruppe innerhalb der Amoebozoa darstellt (Abbildung 2). Heidel et al. berechneten das Alter des letzten gemeinsamen Vorfahren der Dictyosteliden auf mindestens 600 Millionen Jahre [15].

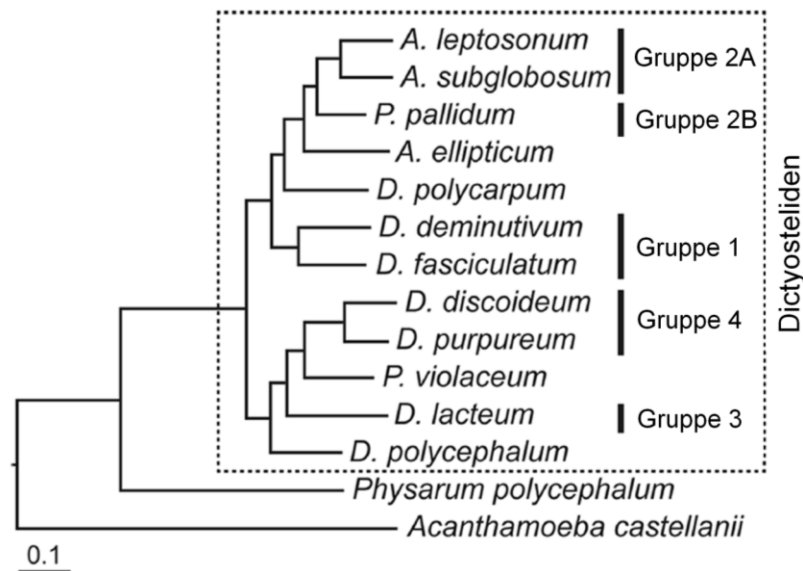
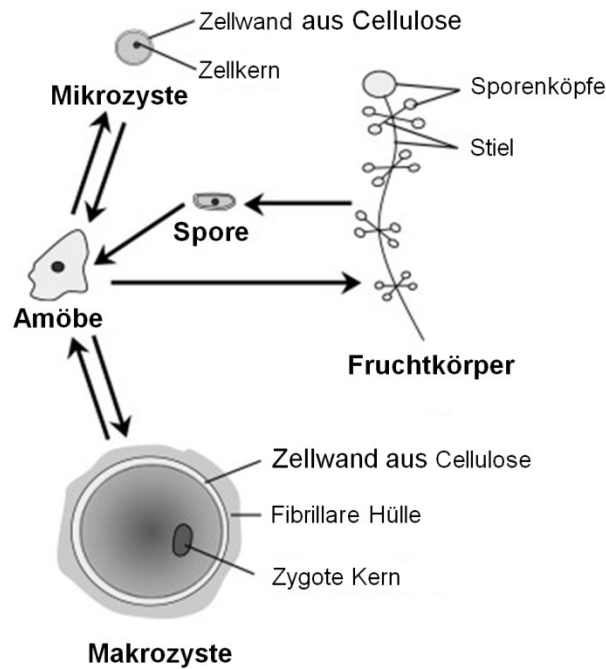


Abbildung 2: Phylogenie der Dictyosteliden. Der phylogenetische Stammbaum wurde berechnet durch den Vergleich von 47 aneinandergelegten Proteinen der untersuchten Arten. Die Wahrscheinlichkeit war 1.0 für alle Nodi [13].

## 1.2 Dauerstadien der Dictyosteliden bei ungünstigen Umweltbedingungen

Eine besondere Eigenschaft der Dictyosteliden ist, dass drei Lebenszyklen vorhanden sind, um ungünstige Lebensbedingungen, z.B. eine zu kleine Bakteriendichte, zu überdauern. Die sozialen Amöben können eine Mikrozyste (nicht Dictyosteliden der Gruppe 4), eine Makrozyste oder einen Fruchtkörper als Dauerstadium bei ungünstigen Lebensbedingungen ausbilden (Abbildung 3) [16].



**Abbildung 3:** Dauerformen der sozialen Amöben hier am Beispiel von *Polysphondylium pallidum*. Die Amöbe kann bei ungünstigen Umweltbedingungen (hohe Osmoralität, Nahrungsmangel usw.) eine Mikrozyste, eine Makrozyste oder einen Fruchtkörper ausbilden. Die Mikrozyste entsteht aus einer einzelnen Amöbe. Die Makrozyste und der Fruchtkörper bilden sich aus einer Vielzahl von Amöben. Abbildung modifiziert nach [16].

Die Mikrozystenbildung wird überwiegend bei erhöhter Osmoralität in der Umgebung gebildet und entsteht indem sich die Amöbe mit einer Zellulosewand umgibt. Die Makrozyste (sexueller Zyklus) entwickelt sich, wenn sich zwei haploide Zellen unterschiedlicher Paarungstypen vereinigen und andere Amöben anlocken und verdauen. Von einigen angelockten Zellen wird eine Zellwand aus Zellulose gebildet. In der nun diploiden Zelle läuft die Rekombination und Meiose ab, was zu Hunderten neuen Rekombinanten führt. Die Makrozyste entsteht überwiegend bei Nahrungsmangel in der Dunkelheit [17-20].

Der komplexeste und am besten untersuchte Zyklus ist der multizelluläre Zyklus. Diese Entwicklung wird bei Nahrungsmangel unter hellen Bedingungen (Oberfläche der Erde) bevorzugt. Interessant ist dieser Zyklus, da an dessen Anfang einzellige Amöben vorhanden sind, während am Ende ein Fruchtkörper mit bis zu fünf unterschiedlichen Zelltypen entstanden ist (bei *Dictyostelium discoideum*) [21]. Die Aggregation und Zelldifferenzierung werden durch eine je unterschiedliche interzelluläre Kommunikation in den einzelnen Entwicklungsstadien bewerkstelligt [21, 22]. Bei beginnendem Nahrungsmangel wird ein Acrasin, also ein Signalmolekül, welches die Aggregation in den sozialen Amöben vermittelt, sekretiert. Die Zellen reagieren

chemotaktisch auf das Acrasin und bewegen sich in Richtung der höheren Konzentration [23, 24]. Das entstehende Aggregationszentrum entwickelt sich zu einem erhabenen runden Aggregat, dem Mound-Stadium. Die Zellen bilden durch die Zellwanderung in die Mitte des Mounds eine Röhre aus, die „Finger“ genannt wird. Der Finger fällt zu Boden. Dieses Entwicklungsstadium heißt „Slug“. Bei *D. discoideum* ist der Slug ein motiler Zellverbund, der nach einem Platz mit geeigneten Bedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit und Licht) sucht, um einen Fruchtkörper auszubilden [25]. Sind gute Bedingungen gefunden, bildet sich der „Mexican Hat“ und schließlich der Fruchtkörper. Der Fruchtkörper umfasst aus Stiel und Sporenkopf. Der Stiel wird aus abgestorbenen Amöben (ca. 20 % des Aggregats) gebildet und aus ca. 80 % des Aggregats entwickeln sich stabile Sporen, die in den Sporenköpfen auf Umweltbedingungen warten, bei denen sich die Amöben wieder im vegetativen Zustand vermehren können (Abbildung 4) [22, 26].

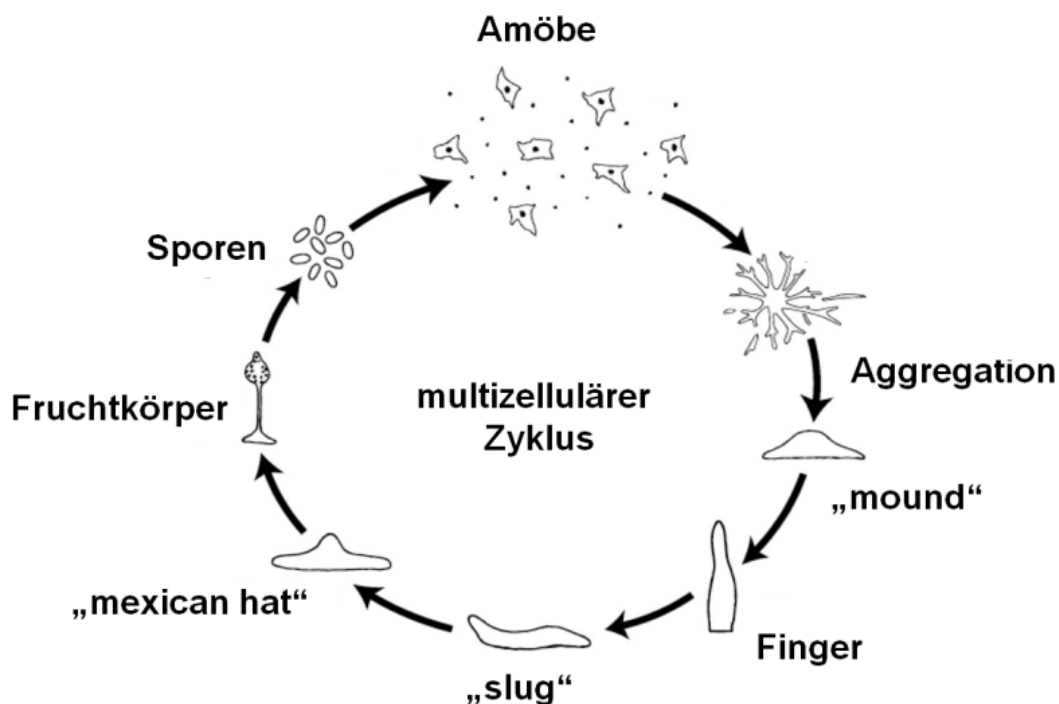


Abbildung 4: Der multizelluläre Zyklus am Beispiel von *Dictyostelium discoideum*. Abbildung modifiziert nach [27].

### 1.3 Die Kommunikation während der Aggregation bei *D. discoideum*

Solange genügend Bakterien in der Umgebung vorhanden sind, reagieren die vegetativen Amöben chemotaktisch auf Folat, ein sekretiertes Molekül der Bakterien, und nehmen die Bakterien durch Phagozytose auf [28-30]. Wenn die Bakteriendichte unterhalb eines kritischen Wertes sinkt, stoppen die Amöben ihren vegetativen Zyklus und beginnen mit der interzellulären Kommunikation untereinander. Für einen Fruchtkörper kommunizieren, aggregieren und differenzieren bis zu 100 000 Zellen [31]. Einige Gründerzellen beginnen damit, cAMP, das Acrasin von *D. discoideum*, zu sekretieren. Das cAMP wird von den anderen Zellen über den cAMP-Rezeptor CAR1 registriert [32]. Das cAMP-Signal löst zwei Reaktionen aus: 1. die Chemotaxis der Zelle in Richtung der höheren cAMP-Konzentration und 2. die cAMP-induzierte cAMP-Sekretion. Dadurch wird das cAMP-Signal in der Amöbenpopulation weitergegeben. Das cAMP wird periodisch im Abstand von 6-7 min sekretiert (Abbildung 5 A) [33]. Diese molekulare Oszillation ergibt sich durch ein Zusammenspiel von mehreren Proteinen. Bei der Bindung von cAMP an CAR1 steigt die Aktivität der Adenylylcyclase A (ACA) und der Proteinkinase ERK2. Die nun stimulierte ACA produziert ihrerseits mehr cAMP und ERK2 hemmt die intrazelluläre cAMP-Phosphodiesterase RegA, was den Abbau von cAMP reduziert. Das meiste cAMP wird über den ABC-Transporter AbcB3 sekretiert [34]. Das sekretierte cAMP wird von der extrazellulären cAMP-Phosphodiesterase PdsA hydrolysiert und so inaktiviert. Das intrazelluläre cAMP bindet an der regulatorischen Untereinheit (R) der Proteinkinase PKA, die dann die katalytische Untereinheit (C) freigibt. Die katalytische Untereinheit der PKA hemmt die ACA und ERK2. PKA ist somit für die negative Rückkopplung und die Reduktion der cAMP-Konzentration verantwortlich (Abbildung 5 B) [22, 33, 35].

Wenn nur eine Komponente in diesem Zyklus fehlt, kann das zum Ausfall der Aggregation führen. Schwebs et al. zeigten, dass die Deletion von ERK2 das Ausbleiben der Chemotaxis bewirkt [36]. Der Abbau des extrazellulären cAMP durch PdsA ist wichtig, um den Gradienten weiter zu verschärfen und so die Effizienz der Chemotaxis zu erhöhen [37, 38]. Tweedy et al. entdeckten, dass selbstgenerierte Gradienten den Effekt eines natürlichen Gradienten noch verstärken können [39, 40]. Ohne den Abbau würde die Konzentration nicht abnehmen und die oszillierende Eigenschaft verlorengehen. Des Weiteren wäre die Chemotaxis nicht möglich, da bei einer zu hohen Konzentration von cAMP die Richtungsinformation verschwindet.

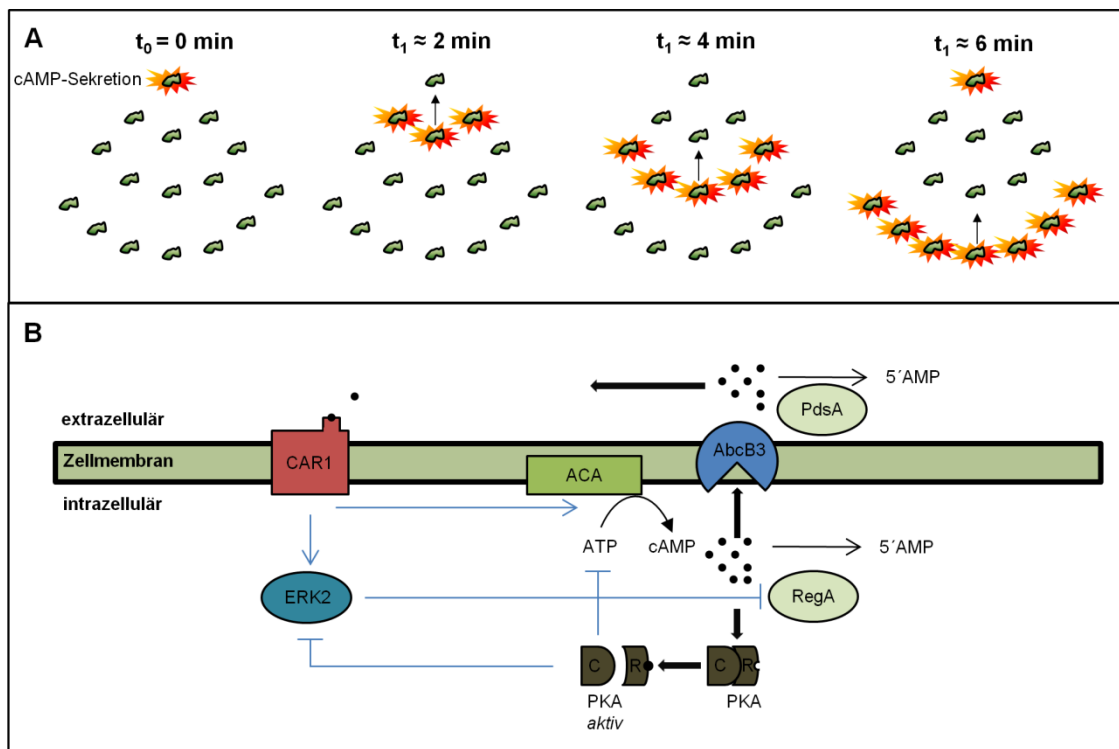


Abbildung 5: A: cAMP-Welle in einer Amöbenpopulation. Die Gründerzelle startet die cAMP-Sekretion. Die umliegenden Amöben empfangen das cAMP-Signal und sekretieren weiteres cAMP. Dabei reagieren die Amöben auch chemotaktisch auf den cAMP-Gradienten und bewegen sich auf die Amöbe zu. So wird das cAMP-Signal in der Population weitergegeben. Nach 6-7 min startet die Gründerzelle eine weitere cAMP-Welle (cAMP-Oszillator). B: Beteiligte Komponenten des cAMP-Oszillators. CAR1 cAMP-Rezeptor, ACA Adenylylcyclase A, AbcB3 cAMP-Transporter, RegA und PdsA Phosphodiesterasen, ERK2 Proteinkinase, PKA Proteinkinase A (C katalytische Untereinheit und R regulatorische Untereinheit). Blaue Pfeile: aktivierende Wirkung, Blauer Strich: hemmende Wirkung. Abbildung modifiziert nach [22, 33, 35]

## 1.4 Die Acrasine der sozialen Amöben

cAMP als Acrasin konnte bis jetzt nur für Dictyosteliden der Gruppe 4 nachgewiesen werden [41]. Von einigen anderen Dictyosteliden konnte das Acrasin isoliert werden. De Wit konnte für *D. minutum*, eine Spezies der Gruppe 3, Folat als Signalmolekül für die Aggregation identifizieren [42]. Van Haastert erkannte Neopterin als Acrasin für *D. lacteum*, auch eine Spezies der Gruppe 3 [43]. Wurster und Shimomura bestimmten Glorin als das Acrasin von *P. violaceum*, einer Außengruppe zu Gruppe 4 [44, 45]. Shimomura konnte auch zeigen, dass *P. pallidum*, eine Spezies der Gruppe 2B, auf Glorin in Chemotaxis-Assays reagiert [45]. Asghar et al. weiteten diese Kenntnis mithilfe eines Chemotaxis-Assays auf Spezies der Gruppen 1, 2 und 4 mit Glorin und cAMP als Testsubstanz aus. Sie konnten zeigen, dass bis auf *Acytostelium*-Arten alle getesteten Organismen der Gruppen 1 und 2 chemotaktisch auf Glorin reagieren. Die Vermutung liegt nahe, dass Glorin das Acrasin dieser Organismen ist [46]. Wadell entdeckte, dass *D. caveatum*, eine Spezies der Gruppe 3, chemotaktisch auf Glorin reagiert [47]. Somit ist Glorin neben cAMP das häufigste Acrasin der bisher untersuchten sozialen Amöben und ist in allen phylogenetischen Gruppen außer Gruppe 4 vertreten. Durch diese Eigenschaft kam die Vermutung auf, dass das auf Glorin basierende Signalsystem das Acrasinsystem des letzten gemeinsamen Vorfahren war und sich alle anderen Systeme erst später entwickelt haben [41, 46]. Dies macht die monophyletische Gruppe der Dictyosteliden zu einem hervorragenden Modellsystem, um adaptive Prozesse von fakultativer Multizellularität in der Evolution zu studieren.



## 1.5 Das Acrasin Glorin

Shimomura identifizierte das Acrasin von *P. violaceum* als *N*-Propionyl- $\gamma$ -L-glutamyl-L-ornithin- $\delta$ -lactamethylester und nannte dieses Molekül Glorin (Abbildung 6). Glorin ist ein ungewöhnliches Dipeptid aus Glutamat und Ornithin- $\delta$ -lactam, verbunden über eine Amidbindung des  $\gamma$ -Carbonylkohlenstoffs vom Glutamat mit der  $\alpha$ -Aminogruppe des Ornithin- $\delta$ -lactams. Die Carbonsäure ist mit Ethanol und die Aminogruppe mit Propionsäure blockiert (Abbildung 6) [44, 45]. Wie oben schon erwähnt, befinden sich in den Gruppen 1-3 Organismen, die auf Glorin chemotaktisch reagieren.

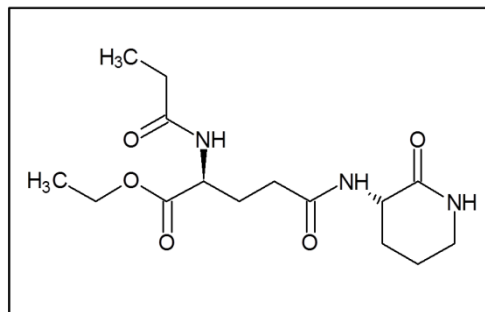


Abbildung 6: Struktur von *N*-Propionyl- $\gamma$ -L-glutamyl-L-ornithin- $\delta$ -lactamethylester (Glorin). Glorin ist ein ungewöhnliches Dipeptid aus Glutamat und Ornithin- $\delta$ -lactam. Die Carbonsäure ist mit Ethanol und die Aminogruppe ist mit Propionsäure blockiert [45].

De Wit et al. untersuchten den Abbau, die Rezeptorbindung und die zelluläre Reaktion nach Bindung von Glorin am Rezeptor im Organismus *P. violaceum*. Sie fanden mehrere Gemeinsamkeiten mit der Aggregation von *D. discoideum*. So konnten sie glorinabbauende Enzyme extrazellulär im Medium und zellgebunden nachweisen. Der Glorinrezeptor ist wahrscheinlich auch ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Die chemotaktische Aktivität ist maximal während der Aggregation und verschwindet bei der späteren Entwicklung. De Wit et al. konnten zwei enzymatische Aktivitäten beim Abbau von Glorin nachweisen [48]. Das aktivere Enzym hydrolysierte den Lactamring vom Glorin und es entstand Verbindung **V2** (Abbildung 7). **V2** besaß keine chemotaktische Aktivität. De Wit et al. schlussfolgerten daraus, dass dieses Enzym Glorin inaktiviert: sie nannten es Glorinase. Sie fanden noch eine zweite schwächere enzymatische Aktivität. Durch diese wird vom Glorin Propionsäure abgespalten und es entsteht die Verbindung **V3** (Abbildung 7) [48].

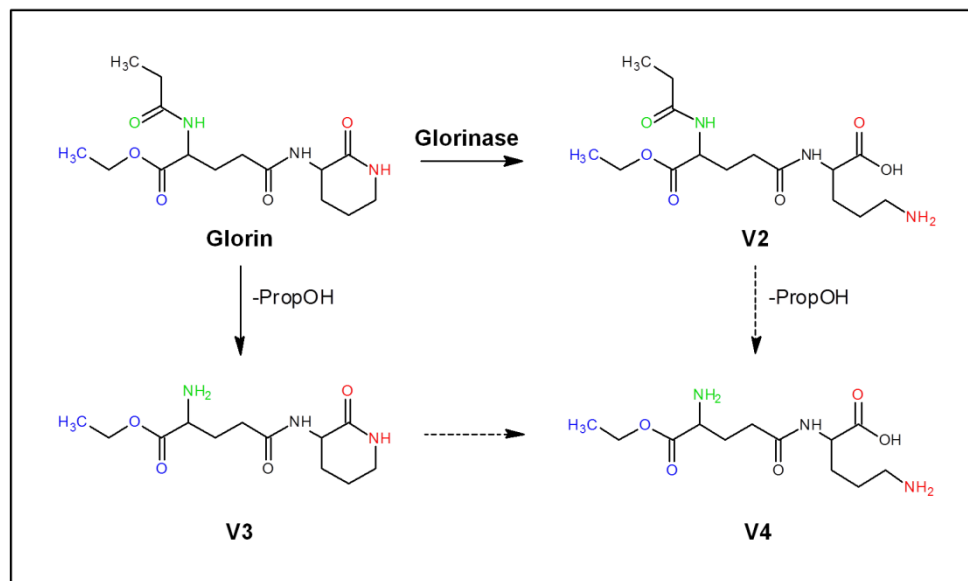


Abbildung 7: Metabolismusmodell von Glorin durch *P. violaceum* nach De Wit et al. [48]. Postuliert werden zwei enzymatische Aktivitäten zum Abbau von Glorin. Das aktivere Enzym hydrolysiert den Lactamring im Glorin und es entsteht Verbindung V2. Da V2 keine biologische Aktivität besaß, nannte De Wit dieses Enzym Glorinase. Er fand noch eine schwächere enzymatische Aktivität. Bei dieser wird vom Glorin die Propionsäure abgespalten und es entsteht Verbindung V3.

Aber De Wit et al konnten keine glorininduzierte Glorinsekretion, ähnlich der zu cAMP bei *D. discoideum*, nachweisen. Die Zeit für die Oszillation der Population von *P. violaceum* in der frühen Aggregation beträgt laut De Wit 2,8 min [48]. Jones berechnete eine periodische Zeit in *P. violaceum* von 2,5-4 min und *P. pallidum* oszilliert in unregelmäßigen Abständen [49]. De Wit et al. vermuteten anhand dieser Ergebnisse, dass Glorin nicht der primäre Oszillator, wie cAMP in *D. discoideum*, ist. Die Anzahl der Glorinrezeptoren im vegetativen Zustand beläuft sich auf 35 000 pro Zelle und steigt während der Aggregation auf 45 000 pro Zelle an. Während der Kulmination konnten De Wit et al. keine Glorinrezeptoren nachweisen [48]. Kopachik konnte eine weitere Ähnlichkeit des Glorinsystems zum cAMP-System ermitteln: Eine Glorinstimulation während der Aggregation führt zur Induktion von einigen Genen. Kopachik pulste eine Schüttelkultur von *P. violaceum* mit Glorin alle 30 min für 2-7 h. In der anschließenden 2D-Gelelektrophorese konnte er 5 Proteine identifizieren, die während der Aggregation verstärkt, und 3 Proteine, die weniger produziert wurden [50]. Asghar et al. untersuchten die geninduzierende Eigenschaft von Glorin auf *P. pallidum* mit vergleichender Transkriptomanalyse (RNAseq) von glorinstimulierten Zellen zu nicht stimulierten Zellen. *P. pallidum* wurde für diese Studie ausgewählt, da das Genom zu dieser Zeit bereits sequenziert war [15]. Asghar fand 115 unterschiedlich exprimierte Gene. Davon waren 70 hochreguliert und 35 herunterreguliert [46].

Bezüglich möglicher Biosynthesewege für Glorin stellte Asghar die Hypothese auf, dass die Biosynthese von Glorin vom Glutathionzyklus abgeleitet sein könnte [51]. Glorin und Glutathion haben einen  $\gamma$ -Glutamatrest. Bei Glorin ist dieser über eine Amidbindung am  $\gamma$ -Carbonylkohlenstoff an Ornithin- $\delta$ -lactam gebunden. Glutathion geht an diesem Kohlenstoff eine Amidbindung mit Cysteinylglycin ein. Ob die Hypothese zutrifft, dass Glorin über die Synthese von  $\gamma$ -Glutamylornithin durch eine dem Glutathionzyklus entlehene  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase erfolgt, ist aber bislang nicht experimentell überprüft worden.

Es werden drei chemische Synthesen von Glorin beschrieben [52-54]. Die Synthese von Glorin nach Barnett et al. ist die vielseitigste, da mit dieser Methode auch Derivate von Glorin hergestellt werden können. So gelang es unter anderem, Glorinamid zu synthetisieren (siehe Ergebnisteil dieser Arbeit). Bei diesem Derivat ist die Esterbindung zwischen Ethanol und Glutamat durch eine hydrolytisch stabilere Amidbindung ersetzt [54].

## 1.6 Das Forschungsobjekt soziale Amöbe

Soziale Amöben und im Speziellen *D. discoideum* werden bereits als Modellorganismen genutzt, um grundlegende Mechanismen in der Zellbiologie zu verstehen [55]. Die sozialen Amöben sind einfach zu kultivieren, entweder auf Agarplatten mit Bakterienrasen oder in einer Schüttelkultur in flüssigem Medium. Sie können relativ leicht transformiert werden und besitzen ein haploides Genom, wodurch sich Gen-Knock-out-Mutanten leichter generieren lassen. Das einzellige Wachstum und die multizelluläre Entwicklung können getrennt voneinander untersucht werden. Der Entwicklungszyklus ist mit 24 h relativ kurz [4, 56]. 2016 waren von 14 Dictyosteliden die Genome sequenziert [13]. Eine Suche nach Genomen von Dictyosteliden in der GenBank [57] (Stand 17.05.2019) ergab 17 Genome. Eine Blastp-Analyse [58] (Stand 17.05.2019) des Protein GAPDH von *D. Discoideum* (UniProt Q94469) konnte in fünf weiteren Dictyosteliden gefunden werden. Das bedeutet das zum derzeitigen Stand 6 Genome der Dictyosteliden vollständig annotiert sind. Diese sind *D. discoideum*, *D. purpureum*, *Acytostelium subglobosum*, *P. pallidum*, *D. lacteum*, *D. Fasciculatum* [15, 59-62]. *D. discoideum* wird z.B. genutzt, um vertiefende Einblicke in Funktionen von Makrophagen im menschlichen Immunsystem zu erhalten [63] oder die Zellbiologie der

Chemotaxis besser zu verstehen [40, 55, 64, 65]. Eichinger et al. identifizierten 33 Orthologe zu krankheitsbezogenen Genen des Menschen in *D. discoideum* [59]. Dadurch können die Funktionen dieser krankheitsbezogenen Gene des Menschen in *D. discoideum* untersucht werden. So entsteht durch Mutationen im humanen VPS13A-Gen die Chora-Acanthocytosis, eine neurologische Erkrankung. Munoz-Braceras et al. bestätigten den Einfluss des *D. discoideum* Orthologs (*TipC*) von *hVPS13A* auf die Autophagie [66]. *D. discoideum* konnte dazu beitragen, einen Mechanismus für den Einfluss von Fettsäure mit mittlerer Kettenlänge auf die Auswirkung von Krämpfen bei Epilepsie zu finden [67]. Es ließen sich schon einige Naturstoffe, die von den sozialen Amöben produziert werden, identifizieren. Werden die sozialen Amöben näher in ihrem ökologischen Umfeld erforscht, können weitere Naturstoffe entdeckt werden. Einige darunter weisen neue antimikrobielle oder antiamöbozide Eigenschaften auf [68-70]. *D. discoideum* kann auch als nicht-tierisches Modellsystem für die Bestimmung von toxikologischen Eigenschaften von neuen Arzneimitteln, Naturstoffen und anderen Chemikalien herangezogen werden. Dabei wird das Zellverhalten (Migration und Zellform) von *D. discoideum* bei Exposition mit der zu testenden Substanz beurteilt, um dann die Toxizität dieser Substanz zu bestimmen [71]. Durch den monophyletischen Ursprung der Dictyosteliden und der verschiedenen Signalsysteme für die Aggregation, eine unterschiedliche Zelldifferenzierung im Entwicklungszyklus und die verschiedenen Morphologien der Fruchtkörper sind die sozialen Amöben ein hervorragendes Modell, um die adaptiven Prozesse der fakultativen Multizellularität zu studieren [5, 12, 13, 15, 21, 41]

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Wenn Glorin das Acrasin von *P. pallidum* ist, müsste *P. pallidum* eine glorininaktivierende Enzymaktivität sekretieren um Glorin zu degradieren, damit sich die Amöben im Gloringradienten orientieren können. In dieser Arbeit soll das glorininaktivierende Enzym, die Glorinase, von *P. pallidum* identifiziert werden. Dafür soll ein HPLC-basierter Bioassay, der Glorinase-Assay, entwickelt werden, um damit die enzymatische Aktivität der Glorindegradation in Zellsuspensionen oder zellfreien Überständen zu bestimmen. Mit dem Glorinase-Assay soll die Glorinaseaktivität in *P. pallidum* und anderen Dictyosteliden ermittelt werden. Die Glorinase soll durch verschiedene säulenchromatographische Methoden und einen anschließenden Glorinase-Assay aktivitätsgeleitet fraktioniert werden. Aus den Aktivitätspeakfraktionen soll die Glorinase durch proteomische Analyse identifiziert werden. Im zweite Teil dieser Arbeit wird die Biosynthese von Glorin genauer untersucht. Als Vorlage dient die Hypothese von Asghar das die Biosynthese durch Teile des Glutathionzyklus erfolgt. Danach könnte eine  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase den  $\gamma$ -Glutamylrest aus Glutathion an Ornithin- $\delta$ -lactam binden und so eine Vorstufe des Glorin bilden. Bioinformatisch soll eine  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase aus *P. pallidum* identifiziert werden. In einem photometrischen Aktivitätstest wird untersucht, ob die rekombinante  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase in der Lage ist, Ornithin oder Ornithin- $\delta$ -lactam auf einen Glutamatrest zu übertragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Wenn nicht explizit angegeben wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck oder Carl Roth mit einer Reinheit von mindestens 95 % bezogen.

Glorin wurde von der Firma Phoenix Pharmaceuticals mit einer Reinheit von mindestens 95 % bezogen.

#### 2.1.2 Stammlösungen

Von in Tabelle 1 aufgeführten Chemikalien wurden Stammlösungen hergestellt, aliquotiert, eventuell steril filtriert und bei -25 °C gelagert.

**Tabelle 1: Hergestellte Stammlösungen deren Lösungsmittel und Konzentration**

Chemikalie	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung	End- konzentration*	**
Glorin	17 mM Phosphatpuffer	3 mM	0,3 mM	a
IPTG	dH <sub>2</sub> O	1 M	0,1 mM	a, s
Ampicillin	dH <sub>2</sub> O	100 mg/mL	100 µg/mL	a, s
Kanamycin	dH <sub>2</sub> O	30 mg/mL	30 µg/mL	a, s
Streptomycin	dH <sub>2</sub> O	20 mg/mL	20 µg/mL	a, s
AEBSF	17 mM Phosphatpuffer	5 mM	0,5 mM	f
Bestatin	17 mM Phosphatpuffer	0,1 mM	0,01 mM	f
Pepstatin A	10 % (V/V) Ethanol in 17 mM Phosphatpuffer	0,1 mM	0,01 mM	f
EDTA	dH <sub>2</sub> O pH 8,0	5 mM	0,5 mM	f
S-(+)-3-Aminopiperidin- Dihydrochlorid	17 mM Phosphatpuffer	30 mM	0,3-3 mM	f
S-3-Amino-2-piperidon- Hydrochlorid	17 mM Phosphatpuffer	30 mM	0,3-3 mM	f
2-Aminocyclohexanon	17 mM Phosphatpuffer	30 mM	0,3-3 mM	f
G418	dH <sub>2</sub> O	350 mg/mL	350 µg/mL	a, s

\* Konzentration in Medium oder Reaktionslösung

\*\* a aliquotiert, s steril filtriert, f frisch hergestellt

### 2.1.3 Kulturmedien und Platten

LB-, HL5- und 1/5-SM-Medien wurden autoklaviert. Für Agarplatten wurde das handwarme Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin, Kanamycin oder G418) supplementiert und direkt in Petrischalen gegossen.

#### LB-Medium

Bacto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL

#### LB-Platten

LB-Medium mit 18 g/l Agar

#### 1/5-SM-Platten

SM Broth/5 (Formedium)	4,74 g
Agar	9 g
dH <sub>2</sub> O	ad 600 mL

#### HL5-Medium

HL5 including Glucose (Formedium)	17,8 g
dH <sub>2</sub> O	ad 500 mL
	autoklaviert
40 % Glucoselösung	10 mL

#### SOC-Medium

Bactopepton	4 g
Hefeextrakt	1 g
Glucose	0,2 g
dH <sub>2</sub> O	200 mL

#### Phosphatplatten

50x Phosphatpuffer	10 mL
Agar	10 g
dH <sub>2</sub> O	500 mL

### 2.1.4 Pufferlösungen

#### 50x Phosphatpuffer (850 mM)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	99,86 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,8 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL
	pH 5,7, autoklavieren

#### 17 mM (1x) Phosphatpuffer

50x Phosphatpuffer	20 mL
dH <sub>2</sub> O	980 mL
	pH 6,2

**Trafo****Salzlösung**

1 M MgCl <sub>2</sub>	1 mL
1 M MgSO <sub>4</sub>	1 mL
Natriumchlorid	0,5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 30 mL

**E50-Puffer**

HEPES	2,38 g
Kaliumchlorid	1,86 g
Natriumchlorid	0,29 g
1 M Magnesiumsulfat	0,5 mL
Natriumhydrogencarbonat	0,21 g
Natriumdihydrogenphosphat·2H <sub>2</sub> O	0,08 g
dH <sub>2</sub> O	ad 500 mL
pH 7,0 KOH steril filtrieren	

**E-Puffer**

Saccharose	8,6 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,681 g
dH <sub>2</sub> O	ad 500 mL
pH 6,1	

**H50-Puffer**

Hepes	2,38 g
Kaliumchlorid	1,86 g
Natriumchlorid	0,29 g
1 M Magnesiumsulfat	0,5 mL
Natriumhydrogencarbonat	0,21 g
Natriumdihydrogenphosphat·2H <sub>2</sub> O	0,08 g
dH <sub>2</sub> O	ad 500 mL
pH 7,0 KOH steril filtrieren	

**Plasmidisolierung****Lösung P1**

1 M Tris/HCl pH8,0	50 mL
0,5 M EDTA pH8,0	20 mL
Glucose	10 g
dH <sub>2</sub> O	930 mL
pH 8,0 NaOH	

**Lösung P2**

2 M NaOH	100 mL
20 % SDS	50 mL
dH <sub>2</sub> O	850 mL

**Lösung P3**

Kaliumacetat	294,5 g
50 % Essigsäure	1000 mL
pH 5,5 HCl	



**Agarose-Gelelektrophorese****10x TBE Puffer pH7,5**

Tris	242,3 g
EDTA	14,9 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61 g
dH <sub>2</sub> O	ad 2000 mL
	pH 7,5 HCl

**1x TBE Puffer**

10x TBE Puffer	100 mL
dH <sub>2</sub> O	900 mL

**10x DNA-Probenpuffer**

Bromphenolblau	30 mg
Xylencyanol	30 mg
0,5 M EDTA pH 8,0	12 mL
1 M Tris/HCl pH 8,0	0,6 mL
86 % Glycerin	17,4 mL

**Proteinreinigung über His<sub>6</sub>-Tag****Bindepuffer (Phosphatpuffer)**

50x Phosphatpuffer	58,8 mL
Natriumchlorid (0,5 M)	29 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL
	pH 7,5 NaOH

**Lysispuffer**

Lysozym (1 mg/mL)	20 mg
Bindepuffer	ad 20 mL

**Elutionspuffer**

Imidazol (0,5 M)	34 g
Bindepuffer	ad 1000 mL
	pH 7,5 HCl

**Proteinfraktionierung****Concanavalin A****Vorwaschpuffer (ConA)**

Natriumchlorid (1 M)	14,6 g
Magnesium(II)chlorid (5 mM)	119 mg
Mangan(II)chlorid · 4 Hydrat (5 mM)	247,4 mg
Calcium(II)chlorid · 2 Hydrat (5mM)	183,8 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 250 mL

**Bindepuffer (ConA)**

Tris (20 mM)	600,6 mg
Natriumchlorid (0,5 M)	7,3 g
Magnesiumchlorid (1 mM)	23,8 mg
Mangan(II)chlorid · 4 Hydrat (1 mM)	49,5 mg
Calcium(II)chlorid · 2 Hydrat (1 mM)	36,8 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 250 mL
	pH 7,5

**Elutionspuffer (ConA)**

Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (0,5 M)	9,7 g
Bindepuffer (ConA)	ad 250 mL    pH 7,5

Anionenaustauschchromatographie (AAC)Bindepuffer 20 mM Tris/HCl pH 8,0

Tris (20 mM)	2,42 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL
	pH 8,0 HCl

Elutionspuffer (AAC)

Natriumchlorid	58,4 g
Bindepuffer (AAC)	ad 1000 mL
	pH 8,0

**SDS-Gelelektrophorese**4x Lower Tris Puffer pH 8,8

Tris	18,17 g
10 % SDS	4 mL
dH <sub>2</sub> O	ad 100 mL

10x Upper Tris Puffer pH 6,8

Tris	15,15 g
10 % SDS	10 mL
dH <sub>2</sub> O	100 mL

12,5 % Trenngel

dH <sub>2</sub> O	7,4 mL
4x Lower Tris Puffer	5,6 mL
30 % Acrylamidlösung	9,4 mL
30 % APS	72 µL
TEMED	24 µL

4 % Sammelgel

dH <sub>2</sub> O	6,2 mL
10Xx Upper Tris Puffer	0,8 mL
30 % Acrylamidlösung	1 mL
30 % APS	24 µL
TEMED	12 µL

10x SDS-Laufpuffer

Tris	60,4
Glycin	288 g
SDS	20 g
dH <sub>2</sub> O	ad 2000 mL

1x SDS-Laufpuffer

10x SDS-Laufpuffer	200 mL
dH <sub>2</sub> O	ad 2000 mL

2x Laemmli-Puffer pH 6,8

Tris/HCl	1,51 g
SDS	4 g
Glycerol	20 g
β-Mercaptoethanol	10 µL
Bromphenolblau	4 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 100 mL
	pH 6,8 HCl

Färbelösung Coomassie

Methanol	300 mL
Konzentrierte Essigsäure	100 mL
Coomassie Brilliant Blue G250	2,5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL

Entfärbelösung

Methanol	300 mL
Konzentrierte Essigsäure	100 mL
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL

Lösungen SilberfärbungFixierlösung

Methanol	450 mL
Essigsäure	50 mL
dH <sub>2</sub> O	500 mL

Sensibilisierer

Natriumthiosulfat	100 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 500 mL

Färbelösung

Silbernitrat	0,5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 500 mL

Entwickler

Natriumcarbonat	10 g
37 % Formaldehyd	541 µL

Stopplösung

Essigsäure	10 mL
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL

**Western-Blot**TBS-Puffer pH 7,5

Tris	6,05 g
Natriumchlorid	8,76 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL
	pH 7,5 HCl

TBST-Puffer

Tween 20	500 µL
TBS-Puffer	ad 1000 mL

Blockierlösung 1 (3 % BSA)

Bovines Serumalbumin	1,5 g
TBST	ad 50 mL

Blockierlösung 2

Magermilchpulver	1 g
TBST	ad 20 mL

Primäre Antikörperlösung

Anti-His <sub>6</sub> -Antikörper von der Maus (Cell Signaling Technology #2366)	20 µL
Blocklösung 1	20 mL

Sekundärer Antikörperlösung

Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat (Cell Signaling Technology #7076)	10 µL
Blocklösung 2	20 mL

**2.1.5 Oligonukleotide**

In diesem Projekt verwendete Oligonukleotide (Primer) wurden von Eurofins MWG Operon bezogen und sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide deren Sequenz, Schmelztemperatur (T<sub>M</sub>) und Verwendung**

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
PPL_G1385236-01	CCATGGTCACCATCACCACCACCAT CAATCCAGTTCGGGCAACACCTACTC	Klonierung in pET-33b(+) fwd
PPL_G1385236-02	GGATCCTTAGTAGGCTTCAAATAATTGTCTCC	Klonierung in pET-33b(+) rev
PPL_G1385236-03	GGATCCCAATCCAGTTCGGGCAACACCTACTC	Klonierung in pMAL c2 und p2 fwd
PPL_G1385236-04	AAGCTTAGTAGGCTTCAAATAATTGTCTCCA	Klonierung in pMAL c2 und p2 rev
PPL_G1385236-05	AGATCTAAAAAATGAGAATATCCAATAATTATTTAGCG	Klonierung in pDM304 fwd
PPL_G1385236-06	CTAGTTAACCTTTATCGTCATCGTCCTTGTAG TCACCGTAGGCTTCAAATAATTGTCTCCAATTC	Klonierung in pDM304 rev
PPL_09347_01	GTGTATGGGCATGTAGTCCAATAAAC	RT-qPCR
PPL_09347_02	CAGTCTCCACCTTGTCTACCATAGATAC	RT-qPCR
PPL_05354-03	GACTCTTGCTCCAACCTCTACCGTTG	RT-qPCR
PPL_05354-04	GTTGTCATCACAGGAGATTTTCAGTGTG	RT-qPCR
PPL_12017-01	GTTGTTCTCATCACTACTGTTTTTCGGAGG	Referenzgen RT-qPCR
PPL_12017-02	GTGGATAAATTGATATTGAAGTCATAG	Referenzgen RT-qPCR
PPL_01946-05	CCATGGGTCATCACCACCATCACCATCAACAAAGTGCACCACT CACTGTCTC	Klonierung in pET-33b(+) fwd
PPL_01946-02	AAGCTTAATAGGCTTCAAAGTATTGTCTCC	Klonierung in pET-33b(+) rev

### 2.1.6 Plasmide und Mikroorganismen

Die in diesem Projekt verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Verwendete Plasmide, deren Eigenschaften und Wirt**

Vektor	Resistenz und genetische Merkmale	Wirt
pGEM-T	lacZ kodierende Sequenz, Amp <sup>r</sup>	<i>E. coli</i>
pET-33b(+)	lacI kodierende Sequenz, Kan <sup>r</sup> , N-terminal: His <sub>6</sub> -Tag/Thrombin/T7-Tag	<i>E. coli</i>
pEX-K4*	lacI kodierende Sequenz, Kan <sup>r</sup>	<i>E. coli</i>
pMAL-c2	lacI kodierende Sequenz, Amp <sup>r</sup> N-terminal: MBP kodierende Sequenz ohne N-terminale Signalsequenz	<i>E. coli</i>
pMAL-p2	lacI kodierende Sequenz, Amp <sup>r</sup> N-terminal: MBP kodierende Sequenz	<i>E. coli</i>
pDM304	Act15 Promoter, Neo <sup>r</sup>	<i>D. discoideum</i> ; <i>P. pallidum</i>

\*Transportvektor bei synthetisch hergestellten Genen von der Firma eurofins

Die in diesem Projekt verwendeten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4: Verwendete *E. coli* und deren Eigenschaften**

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> Top10	F- mcrA Δ( mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ( araleu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B F- ompT gal dcm lon hsdSB(r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -) λ(DE3 [lacI lacUV5- T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(ΔS)
<i>E. coli</i> Origami 2	Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F' [lac <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> pro] (DE3) gor522::Tn10 trxB (Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )
<i>E. coli</i> Rosetta	B F- ompT gal dcm lon? hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (Δ <sup>S</sup> ) pLysSRARE[T7p20 ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL ori <sub>p15A</sub> ](Cm <sup>R</sup> )
<i>E. coli</i> Tuner	F- ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -) gal dcm lacY1(DE3)

Die in diesem Projekt weiteren verwendeten Stämme sind in Tabelle 5 aufgeführt

**Tabelle 5: Verwendete Stämme und deren Stammnummer**

Stamm	Stammnummer
<i>Escherichia coli</i> K12	ATCC 23716; DSM498
<i>Raoultella planticola</i>	ATCC 33531; DSM 3069
<i>Polysphondylium pallidum</i> PN500	DBS0236807
<i>Polysphondylium violaceum</i> Brefeld	ATCC 3416
<i>Polysphondylium asymmetricum</i> OH567 Holotyp	DBS0235724
<i>Acytostelium subglobosum</i> LB1	DBS0235452
<i>Dictyostelium fasciculatum</i> SH3	DBS0235810
<i>Dictyostelium aureostipes</i> JKS5150	DBS0235725

## 2.2 Zellkultivierung

### 2.2.1 Bakterien

Zur Kultivierung der Dictyosteliden wurden entweder *E. coli* K12 oder *Raoultella planticola* verwendet. 100 mL LB-Medium wurde mit einem Klon inokuliert und 6 h bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.2 *Dictyostelium discoideum* AX2

*Dictyostelium discoideum* wurde in HL5-Medium bei 22 °C und 100 rpm inkubiert, bis die gewünschte Zelldichte erreicht war.

### 2.2.3 *Polysphondylium pallidum* PN500 und andere Dictyosteliden

*P. pallidum* und andere soziale Amöben wurden auf 1/5-SM-Platten zusammen mit *E. coli* K12 oder *R. planticola* bei 22 °C kultiviert. Dafür wurden pro Platte 250 µl einer 6 h Bakterienkultur mit Sporen der Amöbe vermischt und ausplattiert. Die Ernte der vegetativen Amöben erfolgte vor den ersten Zeichen der Aggregation. Die Amöben/Bakterien-Suspension wurde 3x bei 150 g 5 min zentrifugiert, um die Amöben bakterienfrei zu waschen.

### 2.2.4 Herstellung glorinasehaltiger Überstände und Amöben

Um glorinasehaltige Überstände zu gewinnen, wurde die Zelldichte auf  $2 \cdot 10^7$  Zellen/mL in 17 mM Phosphatpuffer pH6,2 eingestellt. Die Amöbensuspension wurde 1-8 h bei 100 rpm und 22 °C inkubiert sowie 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und filtriert (Porendurchmesser 0,45 µm) und das Pellet in 17 mM Phosphatpuffer resuspendiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -25 °C gelagert. Der Glorinase-Assay bestimmte die Glorinaseaktivität.

### 2.2.5 Pulsexperimente mit Glorin und seinem Metaboliten

Um die biologische Aktivität des Glorins und dessen Metabolit vergleichen zu können, erfolgten Pulsexperimente mit *P. pallidum*.

Die Zellen wurden geerntet und in 17 mM Phosphatpuffer resuspendiert auf einen Titer  $2 \cdot 10^7$  Zellen/mL eingestellt. Die Zellen wurden für 30 min vorgehungert (22 °C, 100 rpm), und danach für 1 h alle 30 min (2x) 1 µM Glorin, Metabolit oder dH<sub>2</sub>O (negativ Kontrolle) hinzugegeben. Nach dem letzten Puls wurde die Zellsuspension 30 min weiter inkubiert, um dann jeweils  $1 \cdot 10^7$  Zellen zu ernten und zu pelletieren (16000 g, 1 min). Die Pellets wurden bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde aus diesen Zellen die RNA isoliert und davon die cDNA hergestellt.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Transformation von Bakterien und Dictyosteliden

#### *Escherichia coli*

Plasmide wurden zur Vermehrung in *E. coli* Top10 und für die Genexpression in *E. coli* BL21 (DE3) oder einen anderen Expressionsstamm eingebracht. Die Transformation der Bakterien erfolgte mittels Elektroporation. Dafür wurden 2 µl der vorher eingestellten Plasmidlösung mit 50 µL kompetenten Zellen vermischt. Anschließend erfolgte die Elektroporation bei 1,8 kV (exponentiell) für 5 ms. Danach wurde die Zellsuspension mit 1 mL SOC-Medium und 30 µL Salzlösung vermischt. Die Zellsuspension wurde für 45 min bei 37 °C inkubiert. 100 µL und 900 µL des Transformationsansatzes wurden auf LB<sub>Kan</sub>-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

#### *Dictyostelium discoideum* AX2

$2 \cdot 10^7$  Zellen/Transformation wurden frisch aus HL5 pelletiert (150 g, 3 min, 4 °C) und in 50 mL E50-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (150 g, 3 min, 4 °C). Das Pellet wurde in kalten E50-Puffer resuspendiert und ein Titer von  $2 \cdot 10^8$  Zellen in E50-Puffer eingestellt. Die Zellen wurden 5 min auf Eis gestellt, um danach 100 µL Zellsuspension mit 20 µg Plasmid in einer gekühlten Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 1 mm) zu vermischen. Danach erfolgte die Elektroporation mit 800 V, die Kapazität betrug 25 µF, der Widerstand war unendlich und einer exponentiellen Abnahme (2x mit einer zwischenzeitigen Pause von 5 s). Danach wurde 1 mL HL5 zum Transformationsansatz hinzugegeben, vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit 10 mL HL5 in Petrischalen gegeben und 20 h bei 22 °C inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und 10 mL HL5<sub>G418</sub> wurden zugegeben. Alle zwei Tage wurde HL5<sub>G418</sub> gewechselt, bis sich Klone bildeten. Diese wurden gepickt und in neue Petrischalen überführt.

#### *Polysphondylium pallidum* PN500

8 Petrischalen wurden mit je  $2 \cdot 10^7$  vegetativen Amöben (bakterienfrei) in 10 mL HL5<sub>Amp/Strep</sub> pipettiert und 17 h bei 22 °C inkubiert. War das Medium nicht durch *E. coli* oder Mikrozysten kontaminiert, ließen sich die Amöben ernten. Dafür wurde das HL5-Medium dekantiert. Die

Amöben wurden mit 2 mL kaltem 17 mM Phosphatpuffer von der Petrischale geerntet. Die Zellsuspension aller Petrischalen wurde vereinigt und für 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL 17 mM Phosphatpuffer resuspendiert, um dann die Zellzahl zu bestimmen. Danach wurden 9 mL EP-Puffer hinzugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in H50-Puffer resuspendiert und auf einen Titer von  $2 \cdot 10^7$  eingestellt. In eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) wurden 10 µL (20 µg) der Plasmidlösung mit 390 µL Amöbensuspension gegeben. Anschließend erfolgte die Elektroporation ( $U = 500$  V;  $t = 0,1$  ms; Intervall = 1 s; Anzahl der Pulse: 10). Danach wurde die Küvette 5 min auf Eis gelagert. Der komplette Transformationsansatz wurde mit 10 mL HL5-Medium in einer Petrischale vermischt und 8 h bei 22 °C inkubiert. Danach wurde das HL5-Medium verworfen und die Amöben mit 1,5 mL kaltem 17 mM Phosphatpuffer geerntet. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 9,5 mL 17 mM Phosphatpuffer resuspendiert und mit 300 µg/mL G418 versetzt. Anschließend wurden 500 µL einer autoklavierten Bakteriensuspension hinzugegeben (1 L LB-Medium mit *E. coli* K12 OD<sub>600</sub> 1,65 → pelletiert und in 20 mL 17 mM Phosphatpuffer resuspendiert → autoklaviert). Diese Zellsuspension wurde für 24 h bei 22 °C und 150 rpm inkubiert, um sie danach für 5 min bei 300 g zu zentrifugieren. Das Pellet wurde in 1 mL der autoklavierten Bakterienlösung resuspendiert. Jeweils 333 µL wurden auf KK2<sub>G418</sub>-Platten plattiert. Die Platten wurden bei 22 °C inkubiert. Nach 3-7 Tagen zeigten sich Plaques von positiven Transformanden. Die Fruchtkörper der Transformanden wurden zur weiteren Kultivierung genutzt.

### 2.3.2 Klonierung

#### Isolierung von Genen aus genomischer DNA

Die Gene der hypothetischen Glorinasen *PPA\_G1385236* (PPL\_00852) und *PPA\_G1286130* (PPL\_01946) wurden aus dem Genom von *Polysphondylium pallidum* mittels PCR amplifiziert. Die PCR wurde mit der High Fidelity Polymerase (Jena Bioscience) durchgeführt. Bei *PPA\_G1385236* wurden mittels PCR die Schnittstellen BglII, SpeI, ein C-terminaler Flag-Tag und ein Stop-Codon eingeführt. Bei *PPA\_G1286130* wurden mittels PCR die Schnittstellen NcoI, BamHI, ein N-terminaler His<sub>6</sub>-Tag und ein Stop-Codon eingeführt. Die PCR-Produkte wurden in pGEM-T ligiert. Die positiven Klone wurden mittels Restriktionsverdauanalyse identifiziert. Für *PPA\_G1385236* wurde ein pDM304-Vektor für die Expression in *D. discoideum* oder *P. pallidum* und für *PPA\_G1286130* ein pET-33b(+)-Vektor für die Expression in *E. coli* verwendet.

#### Synthetisch hergestellte Gene

Die hypothetischen Glorinasen *PPA\_G1385236* (PPL\_00852) und *PPA\_G1374042* (PPL\_11291) und die γ-GT *PPA\_G1318746* (PPL\_06821) wurden von Eurofins Genomics synthetisch hergestellt und lieferte sie in dem Transportvektor pEX-K4. Die Gene wurden am N-Terminus mit einem His<sub>6</sub>-Tag und ohne Signalsequenz generiert und am 3'-Ende mit dem authentischen Stopp-Codon hergestellt. Das Gen wurde für die Klonierung mit den Schnittstellen für NcoI und BamHI versehen.



### 2.3.3 Plasmidisolation aus *E. coli*

Die vermehrten Plasmide wurden aus *E. coli* nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert.

#### 2 mL Kulturvolumen

2 mL LB<sub>Kan</sub> wurden mit jeweils einem Klon der zuvor transformierten Bakterien inokuliert. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde für 1 min bei 9000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 100 µL P1 resuspendiert. Danach wurden 200 µL P2 hinzugegeben, gevortext und 3 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden 150 µL von P3 hinzugegeben. Das Gemisch wurde stark geschüttelt und 5 min auf Eis gelagert. Das nun viskose Gemisch wurde bei 16000 g 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppi mit 3 µL RNase überführt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 300 µL Isopropanol hinzugegeben, kräftig geschüttelt und weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 20 min bei 10000 g zentrifugiert. Nun wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 100 µL 70-prozentigem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde unter Vakuum bei 45 °C getrocknet und anschließend in 50 µL dH<sub>2</sub>O gelöst. Mit dem gereinigten Plasmid erfolgte ein Kontrollverlauf mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Mit dem Klon, der ein korrektes Plasmid vermehrte, fand anschließend eine Plasmidisolierung im 200 mL Maßstab statt.

#### 200 mL Kulturvolumen

200 mL LB<sub>Kan</sub> wurden mit einem Klon inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 mL P1 resuspendiert. Die Suspension wurde mit 10 mL P2 versetzt, stark geschüttelt und 10 min auf Eis gelagert. Danach wurden 10 mL P3 hinzugegeben, ebenfalls stark geschüttelt und 10 min auf Eis aufbewahrt. Die viskose Suspension wurde 10 min bei 5000g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon überführt und zu diesem wurden 20 mL Isopropanol gegeben. Anschließend wurde diese Suspension für 30 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2,5 mL dH<sub>2</sub>O gelöst. Zu der Lösung wurden nun 50 µL RNase gegeben und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Danach wurden 2,5 mL 9 M Lithiumchlorid hinzugegeben und 2 h bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 15 min bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon überführt und mit 5 mL reinstem Ethanol aufgefüllt. Sodann wurde die Suspension für 15 min bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µL dH<sub>2</sub>O gelöst. Danach wurde 1 mL reiner Ethanol hinzugegeben und für 15 min bei 16000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70-prozentigem Ethanol versetzt und für 5 min bei 16000 g zentrifugiert, um es dann unter Vakuum bei 45 °C zu trocknen und anschließend in 200 µL dH<sub>2</sub>O zu lösen.

### 2.3.4 DNA-Sequenzierung

2 µg Plasmid (pGEM-T-Gen) wurden in 15 µL dH<sub>2</sub>O gelöst und von der Firma MWG eurofins mit den hausinternen Primern T7 und M13rev-(-29) sequenziert. Die Sequenzen wurden mit einem Alignment (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) mit der entsprechenden Originalsequenz überprüft [72].

### 2.3.5 RNA-Isolierung

Die RNA von *P. pallidum* wurde mit dem RNeasy mini Kit der Firma Qiagen isoliert. 600 µL RLT-Puffer versetzt mit 6 µL β-Mercaptoethanol wurden zu dem noch gefrorenen Zellpellet gegeben und resuspendiert. Anschließend wurden 600 µL 70-prozentiger Ethanol hinzugegeben und vermischt. Die Suspension wurde auf die Säule gegeben und 1 min bei 9000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säule mit 350 µL RW1-Puffer gewaschen. Sodann wurde die Säule für 15 min bei RT mit DNase (10 µL DNase + 70 µL DNase-Puffer) inkubiert, um sie danach mit 2x 350 µL RW1-Puffer zu waschen, 1 min bei 9000 g zu zentrifugieren und anschließend 2x mit 500 µL RPE-Puffer zu waschen. Die gereinigte RNA wurde mit 2x 50 µL RNase-freiem Wasser in ein frisches Eppi bei 1 min bei 9000 g eluiert. Die RNA-Konzentration wurde bestimmt und mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 250 ng/µL eingestellt. Anschließend erfolgte mit dieser Lösung die Herstellung von cDNA. Die restliche RNA wurde bei -80 °C gelagert.

### 2.3.6 cDNA-Synthese

Aus der isolierten RNA wurde mit dem Omniscript RT Kit der Firma Qiagen cDNA synthetisiert. 500 ng RNA wurden für die Reaktion verwendet. Die Reaktionen wurden mit Oligo(dT)-Primern gestartet. Ansonsten wurde laut Herstellerprotokoll vorgegangen. Mit dieser cDNA fanden im Folgenden qPCRs statt.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Genexpression

Die Expression der hypothetischen Glorinasegene erfolgte in den *E. coli*-Expressions-stämmen BL21(DE3), Rosetta, Origami 2 und Tuner. Die jeweiligen Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm in 2 mL LB<sub>Kan</sub> herangezogen. Damit wurden 200 mL inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde mit 0,1 mM IPTG die Genexpression induziert. Die Genexpression erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen (22-37 °C) bei 140 rpm in einem horizontalen Schüttler. Dafür wurden die Zellsuspensionen vor der IPTG-Zugabe 30 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Die Expressionsdauer betrug 4-22 h.

### 2.4.2 Zellernte und Zellyse

Nach der Expression wurden die Zellen 10 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 mL Lysispuffer (ca. 1,5 mL/g Pellet) resuspendiert und 30 min auf Eis gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (Bandelin Sonoplus HD 2070, Cycle, Power 10-15 %) für 3x 30 s mit jeweils 30 s Unterbrechung unter ständiger Eiswasserkühlung. Die Suspension wurde 30 min bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -25 °C gelagert.

### 2.4.3 Proteinreinigung

Die Reinigung von heterolog hergestellten Proteinen mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Proteine mittels Metallaffinitätschromatographie (IMAC) aufkonzentriert und gereinigt. Dies fand durch eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule

(HiTrap™ Chelating HP CV 1 mL, GE Healthcare) an einer Gradientenpumpe (Econo pump EP-1, Bio-Rad) mit Fraktionssammler statt. Im zweiten Schritt wurden die gesammelten Fraktionen auf einem 12,5 % SDS-Gel aufgetragen, um die Fraktionen mit heterolog exprimierten Proteinen zu ermitteln. Die Fraktionen, die heterolog exprimierte Proteine enthielten, wurden vereinigt und gegen 17 mM Phosphatpuffer dialysiert.

#### **2.4.3.1 Metallaffinitätschromatographie**

Die Proben wurden vor ihrer Auftragung filtriert (Porengröße 0,45 µm). Die Flussrate betrug in allen Schritten 1 mL/min. Die Säule wurde vor Probenauftrag mit 5 Säulenvolumen Bindepuffer equilibriert und die aufgetragene Probe wurde mit 5 Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen. Die Elution des gereinigten Proteins erfolgte mit einem vierstufigen Gradienten: jeweils 5 Säulenvolumen mit Bindepuffer mit 50, 100, 250 und 500 mM Imidazol. Während des Stufengradienten wurde 1 mL Fraktionen gesammelt. Die anschließende SDS-PAGE zeigte, welche Fraktionen das gereinigte Protein enthielten.

#### **2.4.3.2 Entsalzung und Umpufferung**

Die Entsalzung und das Umpuffern der gereinigten Proteine erfolgten mittels Dialyse. Dafür wurden die Fraktionen mit gereinigtem Protein vereinigt und in einen Dialyseschlauch Zelltrans (Roth) mit einer Ausschlussgröße von 8 kDa gefüllt. Die Proteine wurden erst 2 h und dann 17 h gegen 17 mM Phosphatpuffer unter Rühren bei 4 °C dialysiert. Die dialysierte Proteinlösung wurde aliquotiert und bei -25 °C gelagert.

### **2.4.4 Proteinfraktionierung**

Um die Glorinase zu identifizieren, wurden Überstände von *P. pallidum* mit Säulen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften fraktioniert und anschließend wurden die gesammelten Fraktionen auf glorinabbauende Aktivität untersucht. Interessante Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert um einzelne Gelbanden proteomisch zu analysieren.

#### **2.4.4.1 Concanavalin A-Chromatographie**

Concanavalin A aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) ist ein Lektin und bindet Glykoproteine [73]. Damit lassen sich sehr elegant glykosylierte von nicht glykosylierten Proteinen trennen. Es wurde eine Säule mit Concanavalin A-Sepharose®-4B (Sigma-Aldrich) mit einem Säulenvolumen von ca. 2,4 mL gepackt. Die Flussrate betrug in allen Schritten 1 mL/min. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen Vorwaschpuffer gewaschen und anschließend mit 5 Säulenvolumen Bindepuffer (ConA) equilibriert. Der Überstand von *P. pallidum* wurde mit einer VivaSpin® Turbo 15 mit einem Molecular weight cut off (MWCO) von 10 kDa (Sartorius) konzentriert und auf Bindepuffer (ConA) umgepuffert. Anschließend wurde die Probe auf die Säule aufgetragen. Die aufgetragene Probe wurde mit 10 Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte entweder mit 5 Säulenvolumen Elutionspuffer (Trennung von glykosylierten von nicht glykosylierten Proteinen) oder es wurde ein mehrfacher Stufengradient (Fraktionierung der glykosylierten Proteine) von 0 auf 100 % Elutionspuffer angelegt. Während der Elution wurde 1 mL Fraktionen, ansonsten eine Fraktion pro Waschgang, gesammelt. Mit allen Fraktionen erfolgte ein Glorinase-Assay.

#### **2.4.4.2 Anionenaustauschchromatographie**

Die Anionenaustauschchromatographie trennt Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächenladung. Es wurde eine HiTrap Capto Q ImpRes (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 1 mL verwendet. Die Flussrate betrug in allen Schritten 1 mL/min. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen Bindepuffer(AAC) equilibriert. Der Überstand von *P. pallidum* wurde mit einer VivaSpin® Turbo 15 mit einem MWCO von 10 kDa (Sartorius) konzentriert und auf Bindepuffer (AAC) umgepuffert. Anschließend wurde die Probe auf die Säule aufgetragen und mit 5 Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen. Danach wurden die Proteine mit einem linearen Gradienten von 0-100 % Elutionspuffer (1 M NaCl) in 30 min eluiert. Anschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Elutionspuffer gewaschen. Während der Elution wurde 1 mL Fraktionen, ansonsten eine Fraktion pro Waschgang, gesammelt. Mit allen Fraktionen fand ein Glorinase-Assay statt. Für diesen wurden die Probe vorher 10x mit 17 mM Phosphatpuffer (9 µL Fraktion + 81 µL Puffer) verdünnt.

#### **2.4.4.3 Größenausschlusschromatographie**

Mit der Größenausschlusschromatographie lassen sich die Proteine einer komplexen Proteinlösung nach ihrer Größe auftrennen. Die Probe von 56 mL Überstand von *P. pallidum* wurde mittels VivaSpin® Turbo 15 mit einem MWCO von 10 kDa (Sartorius) auf 1,5 mL konzentriert und auf 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 umgepuffert. Die Auftrennung erfolgte an einer Äkta pure 25 (GE Healthcare, Uppsala Schweden) mit einer Superdex Increase 10/300 GL CV 24 mL (GE Healthcare) mit einem Auflösungsvermögen von 10-600 kDa. Die Flussrate betrug 0,5 mL/min. Die Säule wurde mit 3 Säulenvolumen 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 equilibriert. 1 mL Probe wurde auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 1,5 Säulenvolumen 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5. Die Detektion der Proteine erfolgte photometrisch bei 280 nm. Es wurden 2 mL Fraktionen gesammelt. Mit allen Fraktionen wurde ein Glorinase-Assay durchgeführt.

### **2.5 Analytische Methoden**

#### **2.5.1 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration**

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Assay. Die Proteinkonzentration wurde mit einer BSA-Kalibriergeraden im Bereich von 0-30 µg/mL BSA bestimmt. Geeignet verdünnte Proteinproben (150 µL) wurden mit 150 µL Coomassie Protein Assay Reagent (Thermo Scientific) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vermischt. Nach 10 min Inkubationszeit bei RT wurde die Absorption bei 595 nm mit dem Fluostar Optima von BMG Labtech bestimmt.

#### **2.5.2 SDS-PAGE, Western-Blot und Immunodetektion**

Um die Reinheit zu untersuchen, die Größe von Proteinen abzuschätzen und sekretierte Proteine aufzutrennen, wurden SDS-PAGE und eventuell Western-Blot/Immunodetektion genutzt. Es wurden 12,5 % Trenngele mit 4 % Sammelgelen verwendet. Die Gele wurden mit 100-150 µL

Proteinlösung pro Tasche beladen. Als Größenstandard dienten 8 µL PageRuler Prestained Plus (Fisher Scientific). Die Elektrophorese erfolgte bei 110 V, solange der Marker im Sammelgel war, und anschließend für ca. 3 h bei 160 V. Danach wurde das Gel entweder mit Coomassie oder Silberionen angefärbt. Für die Coomassie-Färbung wurde das Gel für 1 h in Färbelösung inkubiert, um anschließend mit Entfärbelösung die Proteinbanden sichtbar zu machen. Die Silberfärbung erfolgte nach dem Protokoll von Shevchenko et al. [74].

Wenn nötig, wurden mit einem zweiten Gel mittels Western-Blot die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham Protran Supported 0,45 NC, GE Healthcare) transferiert. Das Whatman-Filterpapier, die Membran und das SDS-Gel wurden in folgender Reihenfolge in Puffer getränkt und aufeinandergelegt: Anode, 4x Filter (Anodenpuffer 1), 2x Filterpapier + Membran (Anodenpuffer 2) und 4x Filterpapier (Kathodenpuffer), Kathode. Der Blot erfolgte bei 110 mA für 90 min.

Die Membran wurde für 1 h bei RT in Blockierlösung 1 und über Nacht bei 4 °C in primärer Antikörperlösung inkubiert. Die Membran wurde für 30 min in TBST gewaschen. Danach wurde die Membran 1 h bei RT in Blockierlösung 2 und 1 h bei RT in sekundärer Antikörperlösung inkubiert. Danach wurde die Membran 2x je 30 min in TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte durch eine Chemolumineszenzreaktion (Amersham ECL Western Blotting detection reagent, GE Healthcare).

### 2.5.3 Zellzahl-Bestimmung

Um den Titer der Zellsuspension der sozialen Amöben zu bestimmen, wurde der Casy Cell Counter (Schärfe System) verwendet. Dafür wurde die Zellsuspension 1/100 mit 17 mM Phosphatpuffer verdünnt und 10 µL dieser Verdünnung wurden in 10 mL Casy-Messlösung gegeben und vermischt. Vor der Zellmessung erfolgten 3 Reinigungszyklen, um anschließend den Titer in der Probe zu bestimmen.

### 2.5.4 Chemotaxis-Assay

#### 2.5.4.1 Insall-Chamber-Assay

*P. pallidum* wurde geerntet, bakterienfrei gewaschen, mit 17 mM Phosphatpuffer auf einen Titer von  $2 \cdot 10^7$  Zellen eingestellt und resuspendiert. Die Suspension wurde bei 22 °C und 100 rpm 30 min inkubiert, gefolgt von 5 Pulsen von 100 nM Glorin alle 30 min, um die Aggregationskompetenz zu induzieren. Die Insall-Chamber [75] wurde mit 17 mM Phosphatpuffer befüllt. Das Deckgläschen wurde mit 100 µL 17 mM Phosphatpuffer sowie 100 µL der Zellsuspension vermischt und ca. 10 min bei RT inkubiert, damit sich die Zellen darauf absetzen. Danach wurde der Puffer vom Deckgläschen abgenommen und auf die Insall-Chamber gelegt. Jetzt wurde der Puffer im äußeren Kanal abgesaugt und mit Glorin oder Metabolitlösung (100 nM in 17 mM Phosphatpuffer) befüllt. Als Negativkontrolle diente Puffer ohne Substanz. Unter dem Mikroskop wurde auf eine Stelle am Steg fokussiert, an der sich ausreichend viele Zellen befanden. Für 30 min wurde alle 20 s ein Bild aufgenommen.

Die Datenanalyse der aufgenommenen Bilder erfolgte mit Image J (FIJI). Die Zellen wurden mit

dem selbst geschriebenen Plug-in verfolgt, welches die „track-maxima“-Funktion nutzt, um Zellen mit ihrem Halo zu identifizieren. Die Verfolgungsdaten wurden mit dem ibidi „Chemotaxis Tool“ Plug-in analysiert. Daraus wurde der Rose-Plot und Rayleigh-Test ermittelt.

### 2.5.5 Glorinase-Assay

Um die Glorinaseaktivität zu bestimmen, wurden 90  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^7$  Zellen/mL oder zellfreiem Überstand mit 10  $\mu\text{L}$  Glorinstammlösung (3 mM) vermischt und bei 22 °C für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Die Reaktion stoppte durch Inkubation bei 95 °C für 10 min. Die Proben wurden 5 min bei 16000 g zentrifugiert und filtriert in HPLC-Probengefäße pipettiert.

### 2.5.6 RT-qPCR

Vergleichende Genexpressionsanalysen erfolgten mittels RT-qPCR. Die RT-qPCR erfolgte an einem Mx3000P-qPCR-System (Stratagene). Als Färbemittel diente Evagreen™ (Jena Bioscience) verwendet. In 25  $\mu\text{L}$  Ansatz wurden 2,5  $\mu\text{L}$  10x Puffer, 1  $\mu\text{L}$  cDNA (1/10 verdünnte SL), jeweils 300 nM Primer, 200 nM dNTPs, 0,5  $\mu\text{L}$  Evagreen™, 0,5  $\mu\text{L}$  Carboxy-X-Rhodamin (ROX 1/1000 Verdünnung) und 0,25  $\mu\text{L}$  Taq-Polymerase (Jena Bioscience) vermischt. Es wurden die glorininduzierten Gene PPL\_09347, PPL\_05354 verwendet. Die Expression dieser Gene bezog sich auf das Referenzgen *gpdA* (PPL\_12017). Das PCR-Programm gestaltete sich wie folgt: 95 °C 10 min, [95 °C 30 s, 60 °C 30s und 72 °C 30 s] 40 Wiederholungen. Danach wurde eine Schmelzkurve der resultierenden PCR-Produkte bestimmt. Es wurde der Fold change, hungernde Zellen (Glorin- oder Metabolitpuls) bezogen auf vegetative Zellen, nach der Methode von Pfaffl berechnet [76].

### 2.5.7 HPLC-UV

Die Proben aus dem Glorinase-Assay wurden mit einer Agilent 1200 mit einer Agilent Zorbax Eclipse XDB C18-Säule (5  $\mu\text{m}$ , 4,6x150 mm) analysiert. Es wurden 20  $\mu\text{L}$  Probe injiziert. Laufmittel A war 0,1 % TFA in Wasser und Laufmittel B Acetonitril. Angelegt wurde ein linearer Gradient von 5 auf 35 % Acetonitril in 10 min, bei einer Flussrate von 1 mL/min. Falls die Metaboliten weiter erforscht werden sollten, wurden die zugehörigen Peaks aufgefangen und mit HR/MS untersucht.

### 2.5.8 HPLC mit hochauflösender Massenspektrometrie (HR/MS)

Die Lösung der fraktionierten Peaks wurde lyophilisiert und das Lyophilisat wurde in Methanol (HPLC-grade) gelöst. Das Methanol wurde filtriert (0,2  $\mu\text{m}$ ). Die Proben wurden auf einem Exactive™ Plus Orbitrap Massenspektrometer mit einer vorgeschalteten Accucore-C18-Säule (2,6  $\mu\text{m}$ , 2,1x100 mm) analysiert. Laufmittel A war 0,1 % Ameisensäure in Wasser und Laufmittel B war 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril. Es wurde ein linearer Gradient von 5 auf 98 % Acetonitril in 10 min bei einer Flussrate von 0,2 mL/min angelegt.

### 2.5.9 Verdau von Proteinen und MALDI-TOF

Um die Glorinase zu identifizieren, wurden mit 12,5 % SDS-Gelen sekretierte Proteine von *P. pallidum* aufgetrennt und die Proteinbanden mit Coomassie angefärbt. Für die folgende proteomische Analyse wurden die Proteinbanden ausgeschnitten und, die enthaltenen Proteine tryptisch verdaut, um anschließend auf der ultrafleXtreme™ MALDI-TOF (Bruker) die Peptide zu identifizieren. Die Proteinidentifikation erfolgte, indem die gefundenen Peptide mit der Mascot-Software auf das Proteom von *Polysphondylium pallidum* PN500 (SACGB-Datenbank, <http://sacgb.leibniz-flu.de/cgi/index.pl?ssi=free>) abgeglichen wurden.

#### Tryptischer Verdau

Die ausgeschnittenen Gelbanden wurden 3x für 30 min in Wasser gewaschen. Danach wurde das Gelstück in 500 µL 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat/Acetonitril (V/V 1:1) 15 min inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und der Schritt einmal wiederholt. Anschließend wurde das Gelstück in 100 µL Acetonitril gelagert, bis es geschrumpft war. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und 100 µL Ammoniumhydrogencarbonat wurden zum Gelstück gegeben und 5 min inkubiert. Anschließend wurden 100 µL Acetonitril hinzugegeben und 15 min inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgenommen und 100 µL Acetonitril wurden beigemischt und so lange inkubiert, bis dieses geschrumpft war. Dann wurde die Flüssigkeit abgenommen und die Banden wurden getrocknet. Zu der getrockneten Bande wurden 50 µL 10 mM DTT in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat hinzugefügt und für 15 min bei 56 °C inkubiert. Die abgekühlte Flüssigkeit wurde abgenommen. Danach wurden 50 µL 55 mM IAA in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat auf die Gelbande gegeben und 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgenommen. Anschließend wurde das Gelstück 3x in 200 µL 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Gelstück in 100 µL Acetonitril so lange inkubiert, bis es geschrumpft war. Als Nächstes wurde die Gelbande getrocknet.

Zu der getrockneten Bande wurden 10 µL Trypsinstammlösung (1 µg/µl) gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Stammlösung abgenommen und die Bande mit 3 µL 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat befeuchtet. Die Proteine wurden bei 37 °C für 17 h verdaut. Zu der Gelbande wurden 10 µL 0,1 % TFA in Wasser/Acetonitril (V/V 1:1) gegeben. Danach wurde die Gelbande für 10 min im Ultraschallbad und anschließend für 1 h bei RT inkubiert (sowie ab und zu gevortext), um die Peptide zu lösen.

### 2.6 Photometrischer $\gamma$ -GT-Aktivitätstest

Der photometrische  $\gamma$ -GT-Aktivitätstest erfolgte nach Orlowski und Meister [77]. Es wurden 10 mM Magnesiumchlorid und 5 mM L-Glutaminsäure-*p*-nitroanilid in 0,1 M Hepes pH 7,0 gelöst. Von dem Akzeptor für die Glutamylgruppe wurden 20 mM eingesetzt. Es wurde die zehnfache Stammlösung mit 20,3 g/l Magnesiumchlorid, 1,4 g/l L-Glutaminsäure-*p*-nitroanilid und dem entsprechenden Akzeptor hergestellt. Das Volumen eines Reaktionsansatzes lag bei 1 ml. Dafür wurden 100 µL der Stammlösung in 900 µL des Puffers gelöst. Im Anschluss wurden zu der Reaktionslösung 100 µL gereinigte Enzymlösung gegeben. Die Aktivität des Enzyms wurde über die Zeit mit dem Photometer DU 640 Beckmann verfolgt. Dabei wurde die Absorption bei 410 nm gemessen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung eines Glorinase-Assays

Wenn Glorin das authentische Acrasin von *P. pallidum* ist, sekretiert *P. pallidum* Glorin in der frühen Entwicklung um den Hungerzustand zu signalisieren. Um einen effizienten Gloringradient für die Chemotaxis aufzubauen muss *P. pallidum* zusätzlich eine Glorinase sekretieren, die Glorin degradiert um so die Lage des Aggregationszentrum zu zeigen. Diese Glorinase soll in dieser Arbeit charakterisiert und identifiziert werden. Um die Glorinase zu identifizieren, sollte ein HPLC-basierter Glorinase-Assay entwickelt werden. Der Glorinase-Assay wird dann genutzt, um die Peakfraktionen der Glorinaseaktivität in verschiedenen glorinaseangereicherten Überständen zu ermitteln. In den Peakfraktionen soll die Glorinase mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

#### 3.1.1 Analytik von Glorin

Als Erstes wurde die Analytik von Glorin etabliert. Dafür wurde Glorin von der Firma von Phoenix Pharmaceuticals bezogen. Es wurden Glorinlösungen mit Konzentrationen von 30–450  $\mu\text{M}$  hergestellt und davon 20  $\mu\text{L}$  in die HPLC injiziert.

Als Laufmittel dienten 0,1 % TFA in  $\text{dH}_2\text{O}$  und Acetonitril. Ein linearer Gradient von 3 auf 100 % ACN in 30 min bei einer Flussrate von 1 mL/min stellte die Startbedingung dar. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 220 nm. Unter diesen Bedingungen eluierte Glorin nach 8,1 min. Das Glorin zeigte bei 150  $\mu\text{M}$  einen deutlichen Peak und leichte Verunreinigungen bei einer  $\text{RT} > 9$  min. Der Peak nahm mit steigender Konzentration zu (Abbildung 8). Anhand dieser Ergebnisse wurde die Startkonzentration von Glorin im Glorinase-Assay auf 300  $\mu\text{M}$  (Abbildung 8C) gewählt, da ab dieser Konzentration ein enzymatischer Abbau durch Polysphondylium-Zellen gut verfolgbar sein sollte. Glorin hat einen  $[\text{M}+\text{H}]^+$  von 328,1863 (Abbildung 9).



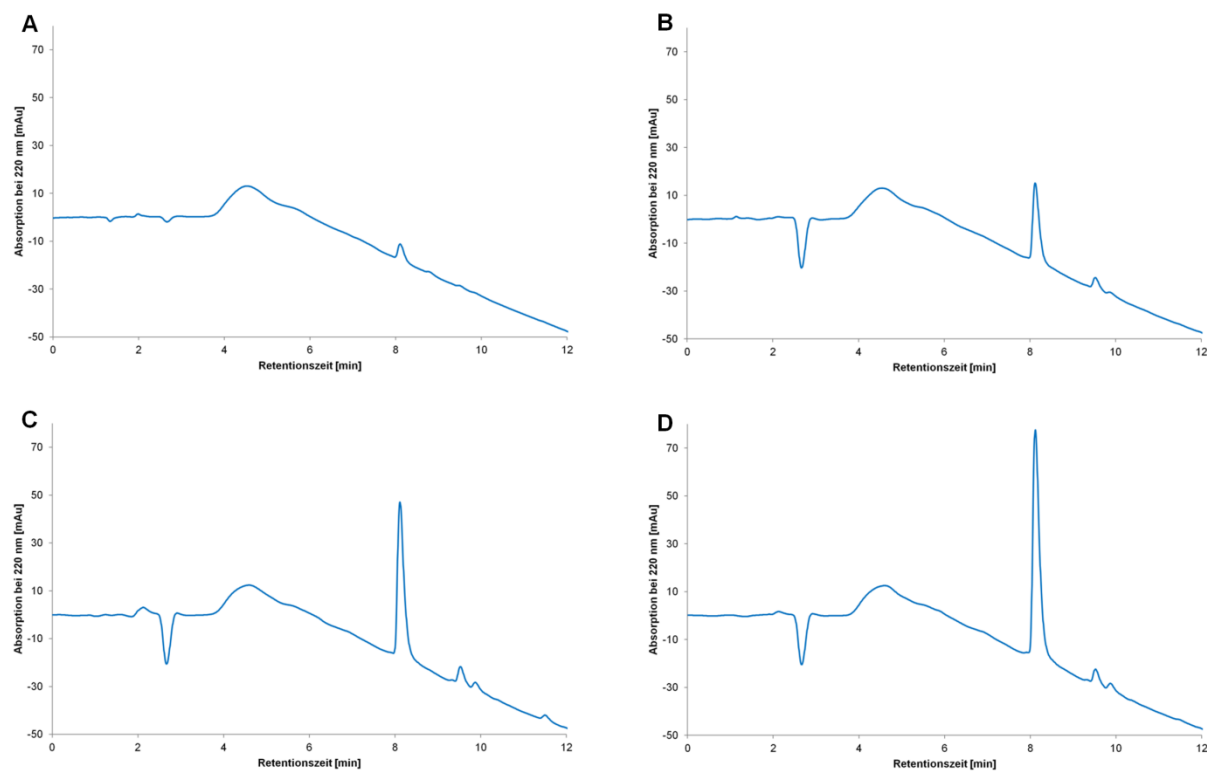


Abbildung 8: Chromatogramme von 30 (A), 150 (B), 300 (C) und 450  $\mu\text{M}$  (D) Glorin. Es wurden jeweils 20  $\mu\text{L}$  Lösung injiziert. Glorin eluierte bei einer RT von 8,1 min.

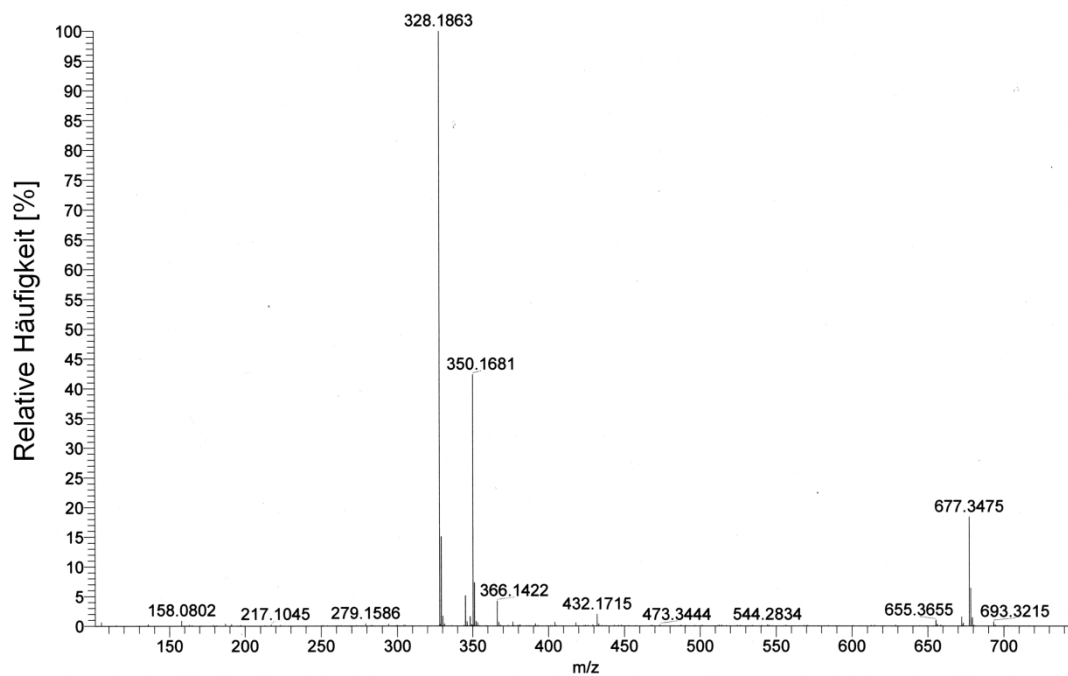


Abbildung 9: Massenspektrum von Glorin.

### 3.1.2 Temperaturstabilität von Glorin

Als Nächstes sollte überprüft werden, bei welchen Temperaturen Glorin stabil ist. Dafür wurden als Startbedingung 17 mM Phosphatpuffer mit pH 6,2 gewählt, da die sozialen Amöben unter diesen Bedingungen in Schüttelkultur (Hungerkultur) gehalten werden. Glorin wurde bei 25 °C und 95 °C für 10 min inkubiert, um anschließend den Abbau von Glorin mittels HPLC zu analysieren.

In den Chromatogrammen konnte sowohl bei 25 °C als auch bei 95 °C nur der Glorinpeak detektiert werden, während keine neuen Produkte registriert wurden (Abbildung 10). Somit lässt sich davon ausgehen, dass Glorin unter diesen Bedingungen (pH-Wert 6,2 und 95 °C) nicht degradiert wird und Enzymassays durch Inkubation bei 95 °C gestoppt werden könnten.

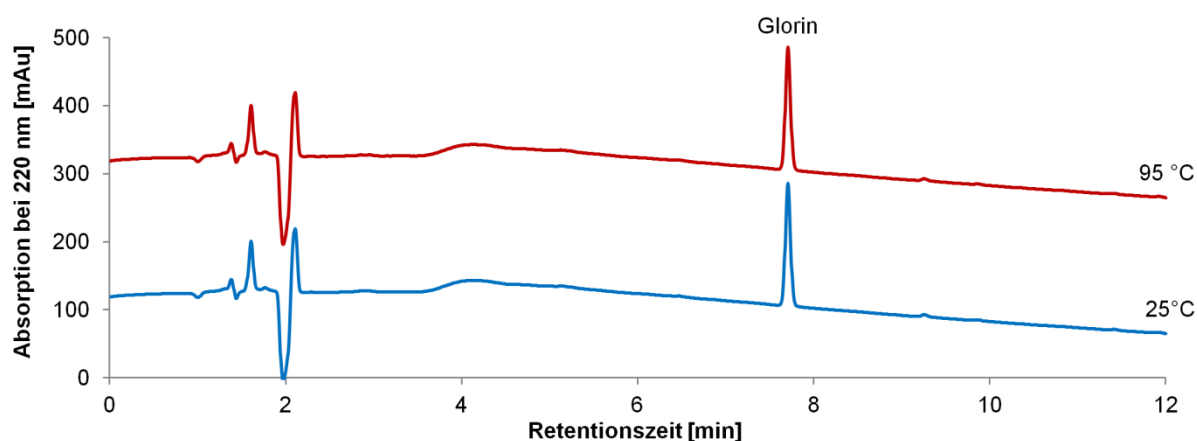


Abbildung 10: Chromatogramme der Bestimmung der Temperaturstabilität von Glorin in 17 mM Phosphatpuffer pH-Wert 6,2 bei 25 °C (blau) und 95 °C (rot) für 10 min.

### 3.1.3 pH-Stabilität von Glorin

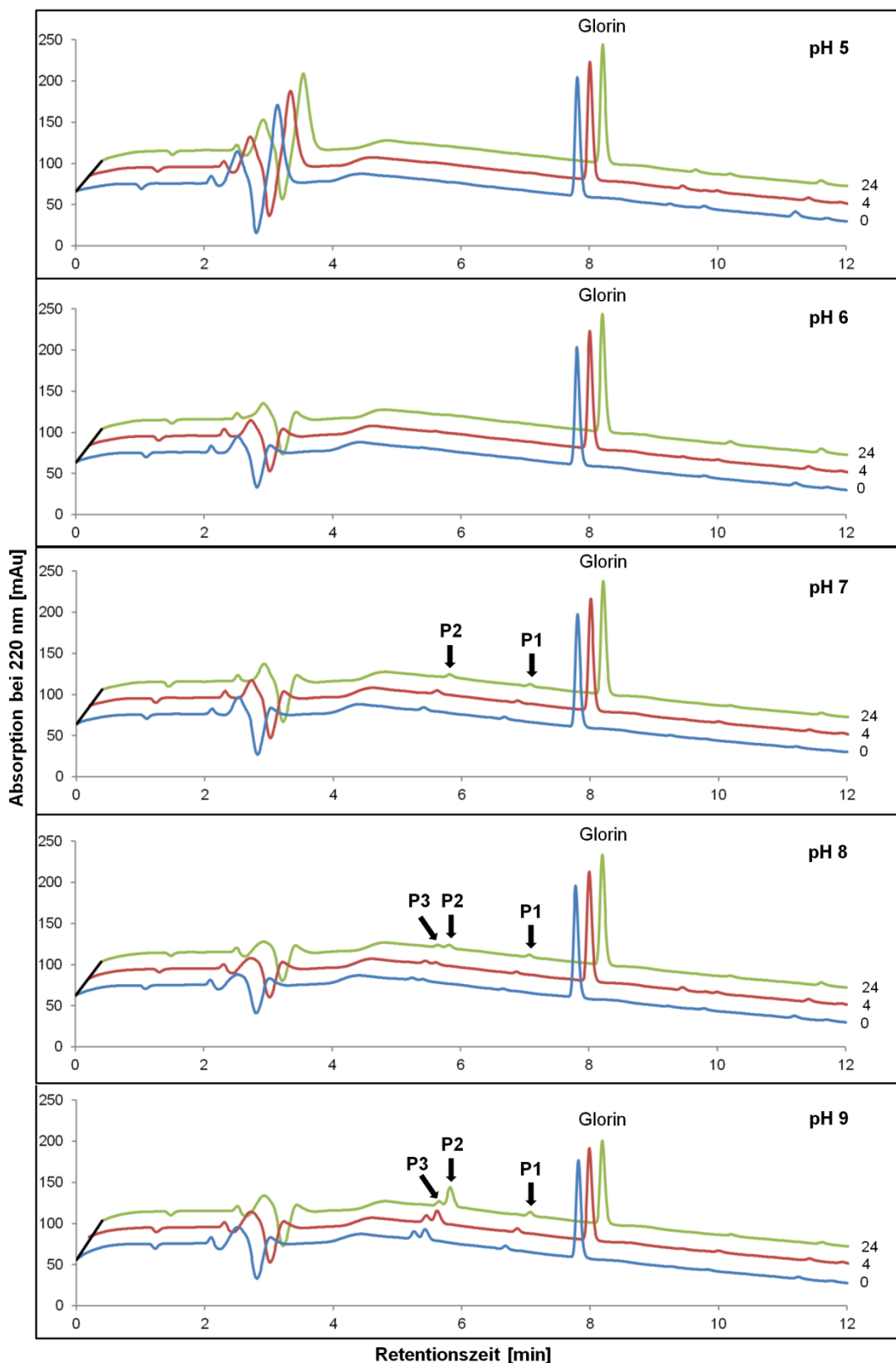
Außerdem sollte die Stabilität von Glorin bei pH-Werten von 5–9 bestimmt werden. Tabelle 6 gibt die Puffer an, mit denen der pH-Wert konstant gehalten wurde. Je 300  $\mu\text{M}$  Glorin wurden in dem jeweiligen Puffer gelöst und 0, 4 und 24 h bei 22 °C inkubiert. Danach wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  dieser Lösung entnommen und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Proben mittels HPLC.

Innerhalb von 24 h zeigte Glorin bei den pH-Werten 5 und 6 keinen zusätzlichen Peak und der Glorinpeak ( $\text{RT} = 7,8 \text{ min}$ ) nahm innerhalb von 24 h nicht ab. Ab einem pH-Wert von 7 ergaben sich zwei weitere Peaks bei Retentionszeiten von 6,7 min (**P1**) und 5,4 min (**P2**) in den Chromatogrammen ab der 0 h-Probe. Bei einem pH-Wert von 8,0 entstand ein dritter zusätzlicher Peak bei einer Retentionszeit von 5,3 min (**P3**). Bei den pH-Wert von 9 zeigten die Chromatogramme auch die drei zusätzliche Peaks **P1**, **P2** und **P3**. Glorin wies schon bei 0 h eine deutliche Degradation auf, die über die Zeit noch zunahm. Bei den pH-Werten von 7 und 8 war keine deutliche Zunahme der Degradationspeaks **P1-P3** von 0-24 h zu sehen. Somit kam unter diesen pH-Bedingungen die Degradation nicht durch die Inkubation bei 22 °C, sondern durch die Inkubation für 10 min bei 95 °C zustande. Nur bei dem pH-Wert von 9 ließ sich eine zeitabhängige Zunahme von **P2** beobachten werden (Abbildung 11). Es kann zusammengefasst werden, dass Glorin bei pH-Werten unterhalb von 7 stabil war und bei pH-Werten oberhalb von 7 Glorin degradiert wurde.

Somit lassen sich Startbedingungen für den Glorinase-Assay wie folgt wählen: 300  $\mu\text{M}$  Glorin in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2, 22 °C Inkubationstemperatur und für die Enzyminaktivierung 10 min bei 95 °C inkubieren. Unter diesen Bedingungen ist ein Abbau von Glorin nur auf eine vorhandene Enzymaktivität zurückzuführen.

Tabelle 6: Eingestellter pH-Wert und der verwendete Puffer

pH-Wert	Puffer
5	50 mM Acetat
6	17 mM Phosphat
7	17 mM Phosphat
8	20 mM Tris
9	20 mM Tris



**Abbildung 11:** Chromatogramme der Stabilitätsuntersuchungen von Glorin bei pH-Werten von 5-9 bei 22 °C. Verwendete Puffer waren beim pH-Wert 5 50 mM Acetattpuffer, beim pH-Wert 6 17 mM Phosphatpuffer, beim pH-Wert 7 17 mM Phosphatpuffer, beim pH-Wert 8 20 mM Tris-Puffer und beim pH-Wert 9 20 mM Tris-Puffer. Nach 0 (blau), 4 (rot) und 24 h (grün) wurden Proben entnommen und 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die HPLC-Analyse. Bei den gezeigten Chromatogrammen handelt es sich um repräsentative Chromatogramme aus einer parallel durchgeführten Dreifachbestimmung.

### 3.2 Glorinaseaktivität in hungernden *Polysphondylium pallidum* Zellen

Um im Folgenden die glorinabbauende Enzymaktivität, die Glorinase, nachzuweisen, wurden vegetative Zellen von *P. pallidum* in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 auf einen Titer von  $2 \cdot 10^7$  Zellen eingestellt und 1-8 h bei 22 °C und 100 rpm inkubiert (Hungerperiode). In dieser Zeit starten die Zellen den Entwicklungszyklus, ohne aber, durch die Schüttelkultur, aggregieren zu können. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (300 g, 5 min) vom Überstand getrennt und anschließend im Ausgangsvolumen mit 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 resuspendiert. Der proteinangereicherte Überstand wurde zusätzlich durch Filtration (0,45 µm) gereinigt.

#### 3.2.1 Sekretierte Glorinaseaktivität

Bereits nach 1 h Hungerperiode konnte die im Überstand enthaltene enzymatische Aktivität Glorin quantitativ innerhalb von 100 min umsetzen. Nach 30 min war Glorin zu 51,8 %, nach 60 min zu 78,5 % und nach 100 min zu 92,9 % umgesetzt. Dabei konnte ein Metabolit **M1** detektiert werden. Anhand der Kinetik zeigte sich, dass die Degradation von Glorin bis 60 min annähernd linear zunahm (Abbildung 12 und Abbildung 13). Es ist denkbar, dass parallel noch weitere Metaboliten entstanden, die sich aber mit UV-Absorption nicht nachweisen ließen.

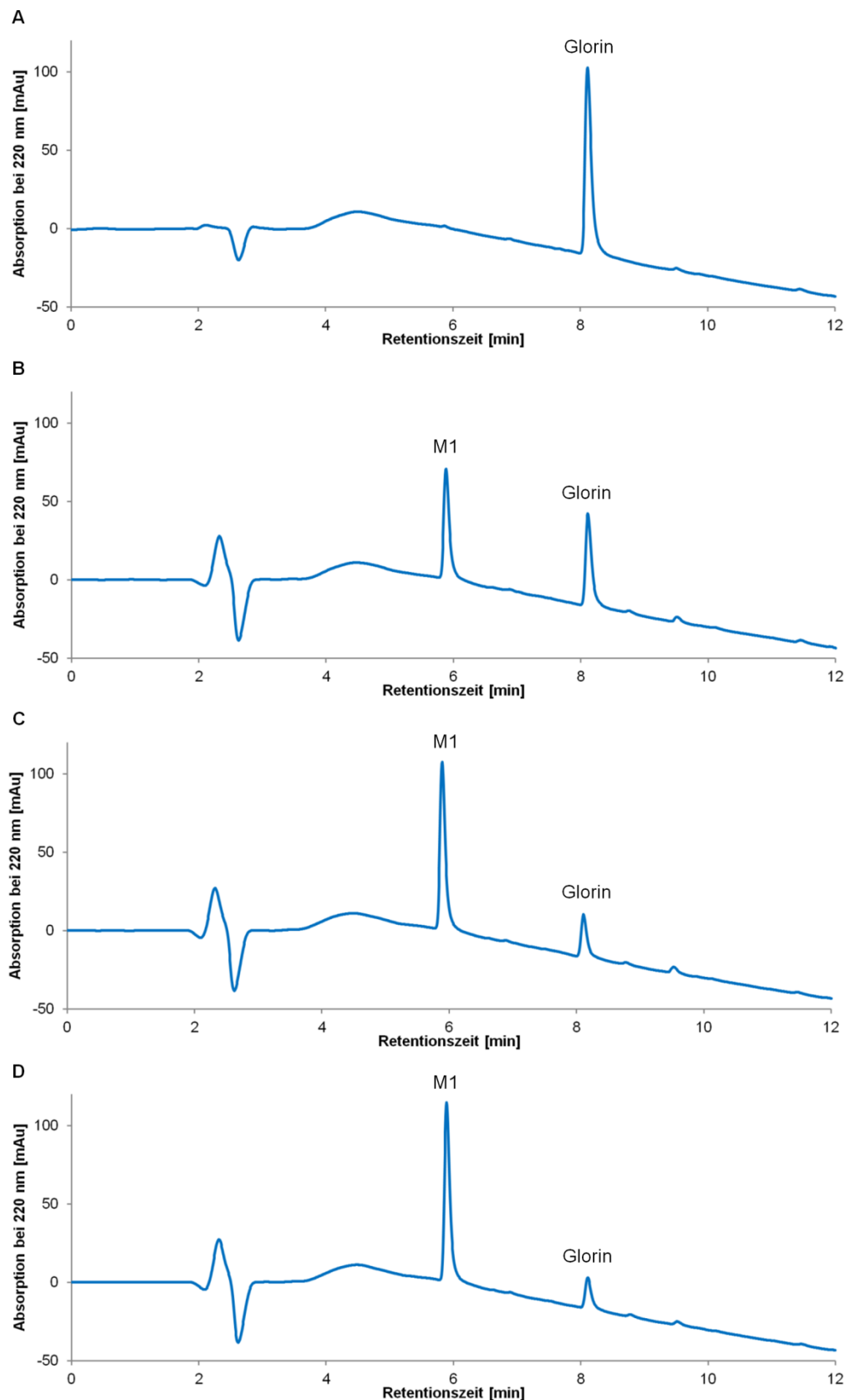


Abbildung 12: Chromatogramme der Glorindegradation durch enzymatische Aktivität im Überstand von hungrigen *P. pallidum* Zellen. Die Zellen wurden in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 bei 100 rpm und 22 °C inkubiert. Nach 1 h wurde der Überstand entnommen und 300  $\mu$ M Glorin wurden zugesetzt und bei 22 °C inkubiert. Die Reaktionszeit betrug bei A 0 min, bei B 30 min, bei C 60 min und bei D 100 min. Glorin wurde innerhalb von 100 min zu einem detektierbaren Metaboliten (M1) abgebaut.

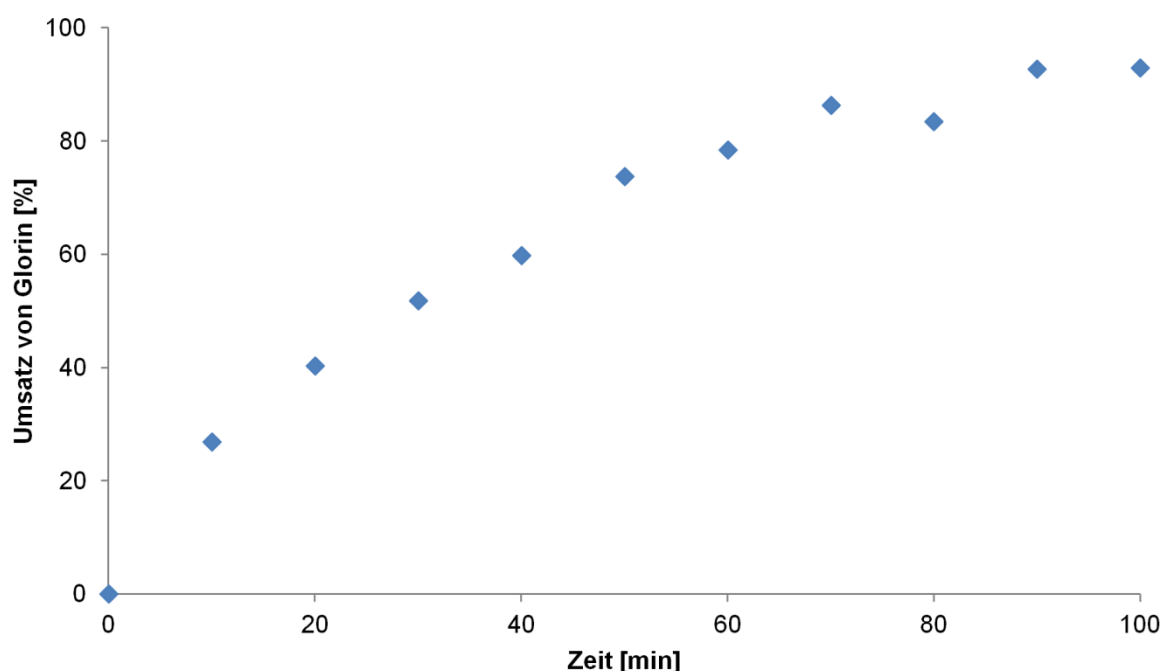


Abbildung 13: Glorindegradation durch enzymatische Aktivität im Überstand von hungernden *P. pallidum* Zellen. Die Zellen wurden in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 bei 100 rpm und 22 °C inkubiert. Nach 1 h wurde der Überstand entnommen 300 µM Glorin wurden zugesetzt und bei 22 °C inkubiert. Nach den angegebenen Reaktionszeiten wurde die Reaktion durch Inkubation bei 95 °C für 10 min gestoppt. Glorin wurde von der Enzymaktivität im Überstand innerhalb von 100 min zu 92,9 % abgebaut.

### 3.2.2 Zellgebundene und sekretierte Glorinaseaktivität während der Entwicklung

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie sich die Glorinaseaktivität im Verlauf der Hungerperiode (HP) entwickelt. Dafür wurden wie oben beschrieben, Zellen und Überstand hergestellt, um damit direkt nach der Entnahme einen Glorinase-Assay bei 22 °C und 30 min (ca. 50 % Umsatz bei HP 1 h) durchzuführen.

Der zellfreie Überstand setzte nach einer Hungerperiode von 1 h 47,5 %, nach 2 h 76,5 %, und nach 4 h 90 % Glorin in 30 min um. Ab 4 h stieg dieser Wert nicht weiter an, da bei 6 h 89,7 % und bei 8 h 92,4 % Glorin umgesetzt wurden. Um auszuschließen, dass die Reaktionszeit der limitierende Faktor bei den 4- bis 8 h-Proben war (d.h. in der Sättigung gemessen wurde), wurden die Überstände zehnfach verdünnt (9 µL Überstand + 91 µL 17 mM Phosphatpuffer), um erneut einen Glorinase-Assay durchzuführen. Dabei gab es wieder eine Steigerung der Glorinaseaktivität bis zur vierten Stunde in der Hungerperiode und bei 6 und 8 h blieb die Glorinase-Aktivität ca. auf dem 4 h-Niveau. Bei der zellgebundenen Glorinaseaktivität zeigte sich ein anderer Verlauf. Bereits direkt

nach der Ernte der vegetativen Zellen (ca. 15–30 min) wurden 13,7 % Glorin in 30 min umgesetzt. Nach 1 h Hungerperiode besaßen die Zellen mit 39 % umgesetztem Glorin die höchste Glorinaseaktivität innerhalb von 8 h Hungerperiode. Nach 2 h sank dieser Wert auf 21,1 %. Ab 4 h war der Wert auf 6 % abgesunken und blieb auf diesem Niveau bis zur Hungerperiode von 8 h (Abbildung 14). Für das Plateau der sekretierten Glorinaseaktivität ab der vierten Stunde gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder stoppte ab der vierten Stunde die Sekretion der Glorinase und das Enzym war stabil in der Lösung oder es bestand ein Gleichgewicht zwischen Sekretion und Degradation der Glorinaseaktivität.

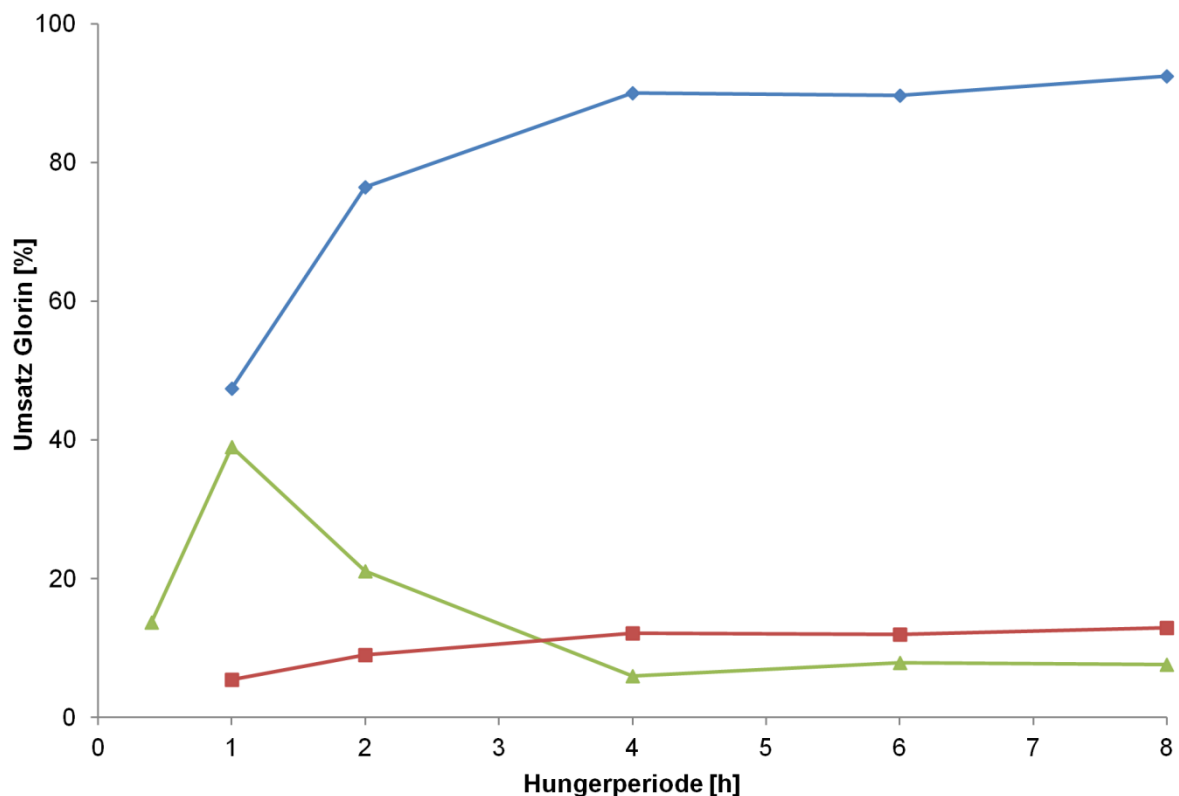


Abbildung 14: Sekretierte und zellgebundene Glorinaseaktivität von *P. pallidum* während einer Hungerperiode bis 8 h in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 bei 22 °C und 100 rpm. Die Zellen wurden per Zentrifugation (300 g, 5 min) vom Überstand getrennt und im Ausgangsvolumen mit 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 resuspendiert. Der Überstand wurde zusätzlich zur Zentrifugation filtriert (0,45 µm). Der Glorinase-Assay erfolgte direkt nach der Probenentnahme (22 °C, 30 min). Das Experiment fand zweimal mit ähnlichen Ergebnissen statt.

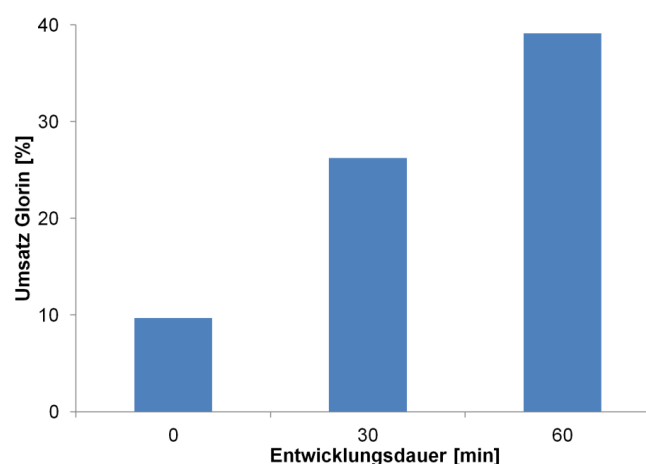


### 3.2.3 Zellgebundene Glorinaseaktivität in vegetativen Zellen

*P. pallidum* zeigte direkt nach der Ernte und dem Waschen der Zellen eine gewisse Glorinaseaktivität (siehe oben). Daher stellte sich die Frage, ob die Glorinaseaktivität auf den Zellen bereits im vegetativen Zustand vorhanden war oder ob die Zellen während der Ernte und des Waschens trotz des Arbeitens auf Eis die Zellen einen Hungerzustand signalisiert bekamen und dadurch vermehrt Glorinase bildeten.

Um diese Frage zu beantworten, wurden die Zellen von den Agarplatten geerntet und die Amöbenkonzentration wurde direkt ohne zwischengeschalteten Zentrifugationsschritt auf  $2 \cdot 10^7$  Zellen/mL eingestellt. Mit dieser Bakterien-Amöben-Suspension erfolgte ein Glorinase-Assay (0 min). Parallel dazu wurden die restlichen Zellen klassisch bakterienfrei gewaschen, um nach 30 und 60 min weitere Glorinase-Assays durchzuführen.

Zellen direkt nach der Ernte zeigten einen Umsatz von 9,7 % Glorin in 30 min. Nach 30 min Entwicklungsdauer konnten die Zellen 26,3 % Glorin und nach 60 min Entwicklungsdauer 39,1 % Glorin umsetzen. Die Glorinaseaktivität nahm um das Vierfache in den ersten 60 min Entwicklung zu (Abbildung 15). Somit ergab sich auch in diesem Versuchsansatz bereits direkt nach der Ernte eine gewisse Glorinaseaktivität an den Zellen. Das Experiment deutet darauf hin, dass bereits in vegetativen Zellen eine Hintergrund-Glorinaseaktivität auf der Zellmembran vorhanden sein könnte.



**Abbildung 15:** Glorinaseaktivität in vegetativen Zellen. Eine Fraktion von *Polysphondylium pallidum* wurde direkt nach der Ernte ohne Waschschrift auf einen Titer von  $2 \cdot 10^7$  Zellen/mL eingestellt, um unmittelbar den Glorinase-Assay durchzuführen. Die andere Fraktion wurde klassisch gewaschen und in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 auf einen Titer von  $2 \cdot 10^7$  Zellen/mL eingestellt. Nach 30 und 60 min der Ernte wurden Zellen entnommen und ein Glorinase-Assay durchgeführt. Die angegebenen Werte entsprechen Einfach-Messungen. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

### 3.2.4 Metabolitenspektrum bei Langzeit-Glorinase-Assay

Da nach De Wit et al. [48] bei der Degradation von Glorin ein Hauptmetabolit (Lactamhydrolyse) und ein Nebenmetabolit (Propionsäureabspaltung) entstehen (siehe Einleitung, Abbildung 7), sollte der Glorinase-Assay mit längeren Reaktionszeiten durchgeführt werden, um eventuelle weitere Metabolite zu detektieren. Dafür wurde eine Hungerperiode von 4 h ausgewählt, da, wie oben gezeigt, zu diesem Zeitpunkt die Glorinaseaktivität am höchsten war. Der Überstand wurde diesmal mit der doppelten Menge (600  $\mu$ M) Glorin versetzt, um eine geringere Umsetzung zu anderen Metaboliten zu detektieren. Die Reaktion wurde bis 50 h durchgeführt.

Glorin (RT 7,7 min) wurde innerhalb von 2 h komplett abgebaut und dabei entstand nur der Metabolit **M1** (RT 5,3 min). **M1** war bis zur vierten Stunde stabil. Ab der achten Stunde konnte ein leichter Abbau von **M1** gezeigt werden. Bei Stunde 22 konnten der Abbau von **M1** und ein zweiter Metabolit **M2** (RT 3,4 min) eindeutig detektiert werden. Bei Stunde 28 ließ sich erkennen, dass dieser Abbau sich fortsetzte (Abbildung 16). Somit kann bei längerer Inkubation ein zweiter Metabolit **M2** ermittelt werden. Da die Bildung von **M2** erst ab der achten Stunde detektiert werden kann, wenn Glorin nicht mehr nachzuweisen war, entstand der Metabolit **M2** wahrscheinlich aus **M1** und nicht durch die Degradation durch Glorin.

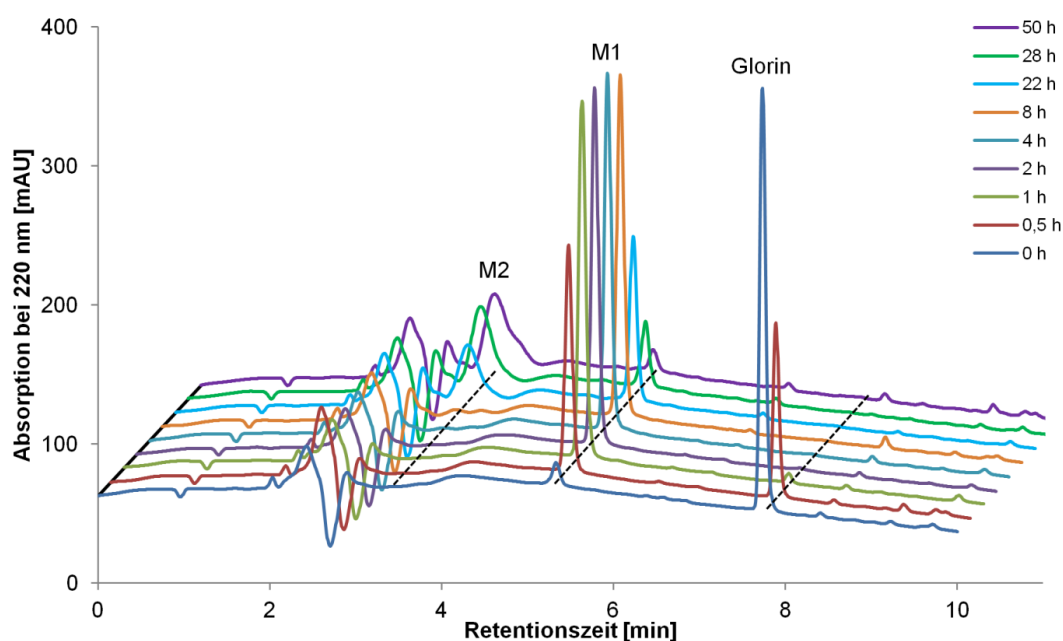


Abbildung 16: Glorinase-Assay mit Überstand von *P. pallidum* nach einer Hungerperiode von 4 h. Der Überstand wurde mit 600  $\mu$ M Glorin versetzt und bei 22 °C mit den angegebenen Zeiten inkubiert.  $RT_{\text{Glorin}} = 7,7 \text{ min}$ ,  $RT_{\text{M1}} = 5,3$ ,  $RT_{\text{M2}} = 3,4 \text{ min}$ .

### 3.2.5 Identifizierung von Glorin-Metaboliten

Zur Metabolitidentifizierung wurde eine hochauflösende Masse zu jedem Metabolitpeak ermittelt. Bei dem Peak von **M1** ergab die Analyse ein  $[M+H]^+$  von 300,1552. Diese Masse passt zu der Summenformel  $C_{13}H_{22}N_3O_5$ . Zu dieser Summenformel kommt man vom Glorin durch Abspaltung der Ethanolgruppe im Carboxylester (Abbildung 17). Bei dem Peak von **M2** ergab die Analyse ein  $[M+H]^+$  von 244,1290. Diese Masse entspricht der Summenformel  $C_{10}H_{18}N_3O_4$ . Ausgehend von der Verbindung **M1** wird diese Masse durch Abspaltung der Propionsäure erreicht (Abbildung 18).

De Wit et. al. postulierten als Hauptaktivität die hydrolytische Aufspaltung des Lactamringes und als Nebenaktivität die Abspaltung der Propionsäure [48]. Dies wurde hier nun widerlegt, sodass noch weitere Experimente nötig waren, um die Bildung der Verbindung **M1** zu bestätigen.

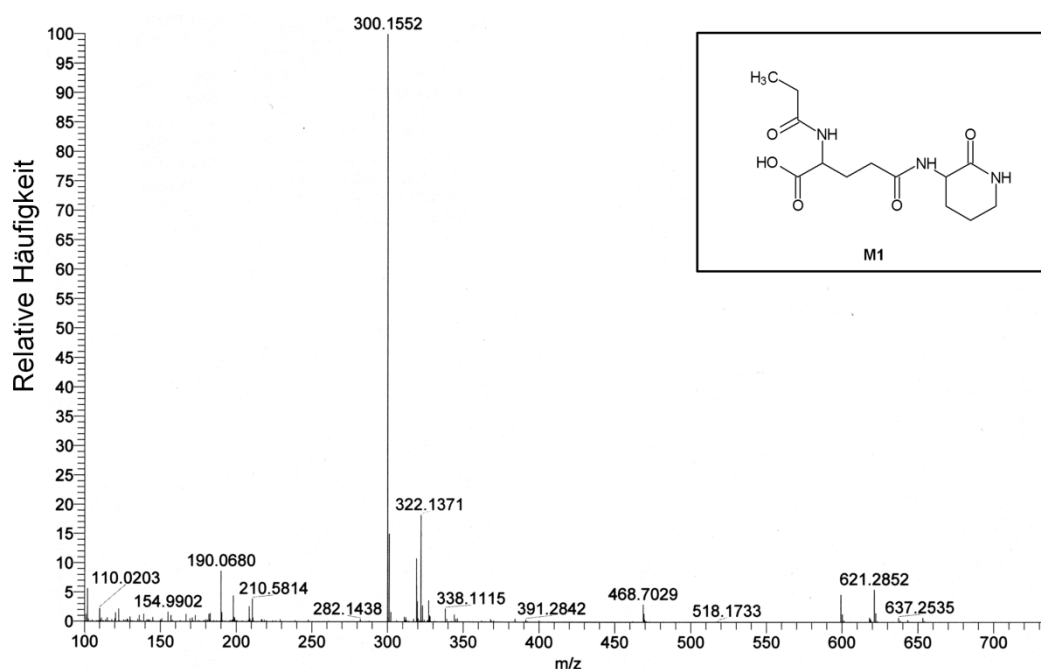


Abbildung 17: Massenspektrum des Metaboliten M1 und die ermittelte Struktur zu dem  $[M+H]^+$  von 300,1552.

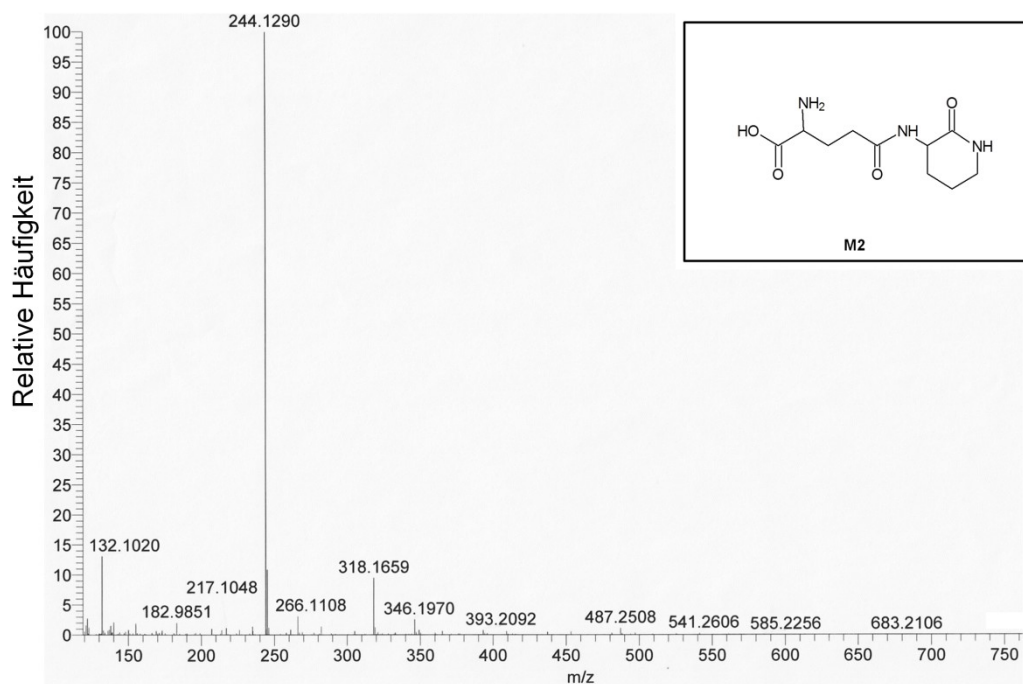


Abbildung 18: Massenspektrum des Metaboliten M2 und die ermittelte Struktur zu dem  $[M+H]^+$  von 244,1290

Um die Struktur der Verbindung **M1** weiter zu bestätigen wurde die von uns postulierte Struktur von Robert Barnett in der Arbeitsgruppe von Pierre Stallforth am Hans-Knöll-Institut Jena synthetisiert. Dabei wurde **M1** im Wesentlichen durch Verseifung von Glorin hergestellt. Die Retentionszeiten des gereinigten enzymatischen **M1** und des chemisch synthetisierten **M1** wurden auf einer analytischen C18-Säule bestimmt. Die Retentionszeit von enzymatischem **M1** betrug 5,1 min und die Retentionszeit von chemischem **M1** war 5,1 min mit einem  $[M+H]^+$  von 300,1555 (Abbildung 19 und Anhang). Somit ließen sich enzymatischer **M1** und chemisch synthetisierter **M1** mit einer C18-Säule nicht unterscheiden. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass es sich bei **M1** um den Metaboliten in Abbildung 18 handelt.

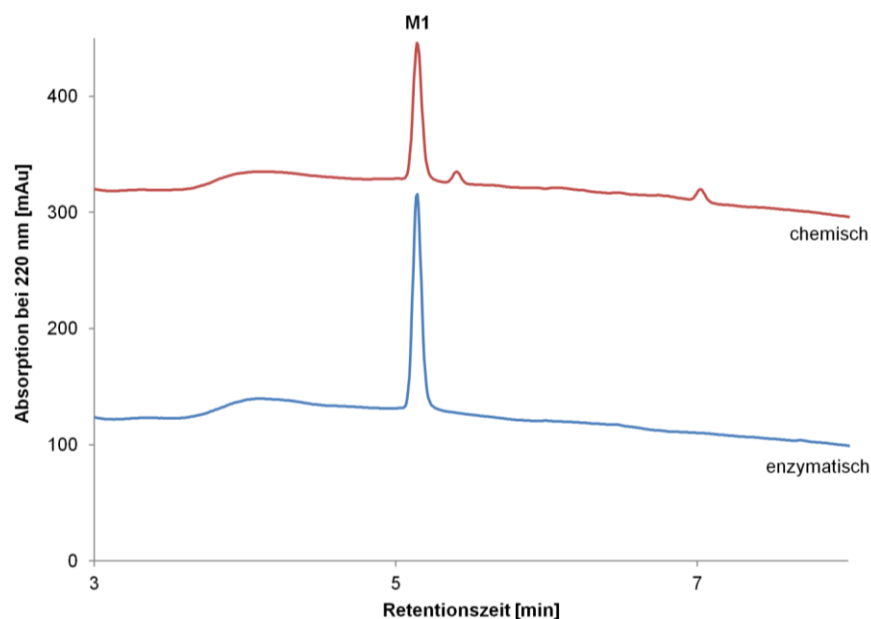


Abbildung 19: HPLC-Analyse des gereinigten Metaboliten **M1**. **M1** wurde enzymatisch durch Inkubation von Glorin mit Überstand von *P. pallidum* und chemisch durch Verseifung von Glorin hergestellt. Beide Verbindungen wurden mittels präparativer C18-HPLC aufgereinigt. Dann wurden die Retentionszeiten dieser Verbindungen auf einer analytischen C18-HPLC bestimmt.  $RT_{\text{enzymatisch}} = 5,1 \text{ min}$ ,  $RT_{\text{chemisch}} = 5,1 \text{ min}$ .

Außerdem wurde parallel die Hitzestabilität von **M1** bestimmt. **M1** wurde für 10 min bei 25 °C und bei 95 °C in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 inkubiert und anschließend mittels HPLC analysiert. Es zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen kein **M1** durch Hitze degradiert wird (Abbildung 20). Somit kann ausgeschlossen werden, dass sich **M2** aus **M1** durch die Hitzeinaktivierung des Glorinase-Assays bildet.

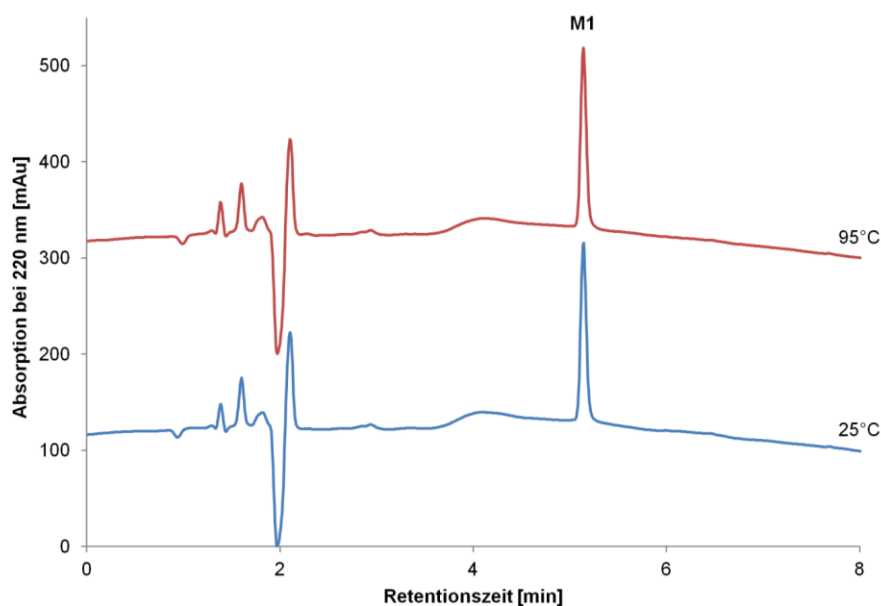


Abbildung 20: HPLC-Analyse der Temperaturstabilität von **M1**. 200 µL einer **M1**-Lösung wurden zu zwei Teilen gesplittet. Der eine Teil wurde 10 min bei 25 °C und der andere Teil 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf einer analytischen C18-HPLC analysiert

Des Weiteren synthetisierte Robert Barnett in Pierre Stallforths Arbeitsgruppe am Hans-Knöll-Institut Jena ein hydrolytisch stabileres Strukturanalogon von Glorin, das Glorinamid [54]. Im Glorinamid ist die Carboxylesterbindung durch eine Amidbindung ersetzt (Abbildung 21).

Nun erfolgten parallel Glorinase-Assays mit Glorinamid und Glorin als Substrat. Wegen der schlechteren Löslichkeit von Glorinamid wurde allen Reaktionsansätzen 2 % DMSO zugesetzt. Wenn Glorin durch die hydrolytische Öffnung des Lactams degradiert werden würde, sollte Glorinamid abgebaut werden, ohne dass ein Peak bei der Retentionszeit von **M1** zu sehen wäre. Falls Glorin durch hydrolytische Abspaltung der Ethanolgruppe degradiert werden würde, sollte Glorinamid nicht oder deutlich langsamer als Glorin abgebaut werden und der Peak von **M1** im Chromatogramm detektiert werden.

Glorin (RT = 7,6min) wurde in diesem Experiment wie erwartet zu **M1** abgebaut. Bereits nach 1 h wurden mehr als 50 % Glorin umgesetzt und **M1** erschien bei der Retentionszeit von 5,1 min. Nach 5 h Reaktionszeit konnte nur noch **M1** identifiziert werden. Somit störte das zugesetzte DMSO den Glorinase-Assay nicht. Glorinamid eluierte auf der C18-Säule bei einer Retentionszeit von 5,9 min. Es konnte kein Abbau von Glorinamid innerhalb von 5 h beobachtet werden (Abbildung 22). Dieses Ergebnis unterstreicht die Annahme, dass Glorin von den Zellen durch Ethanolabspaltung degradiert wird.

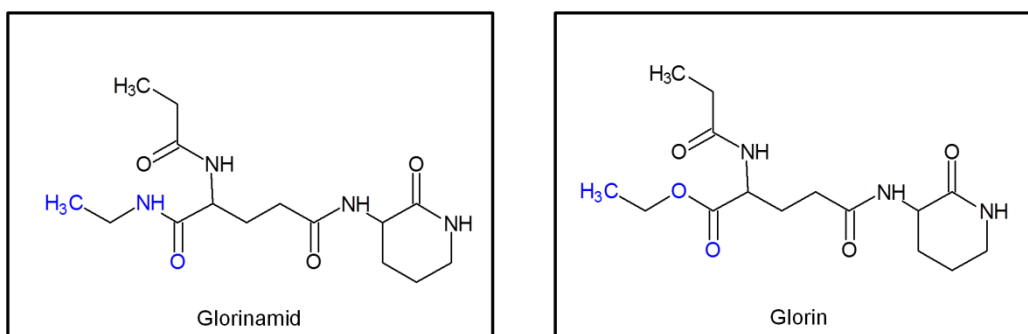


Abbildung 21: Struktur von Glorinamid und Glorin

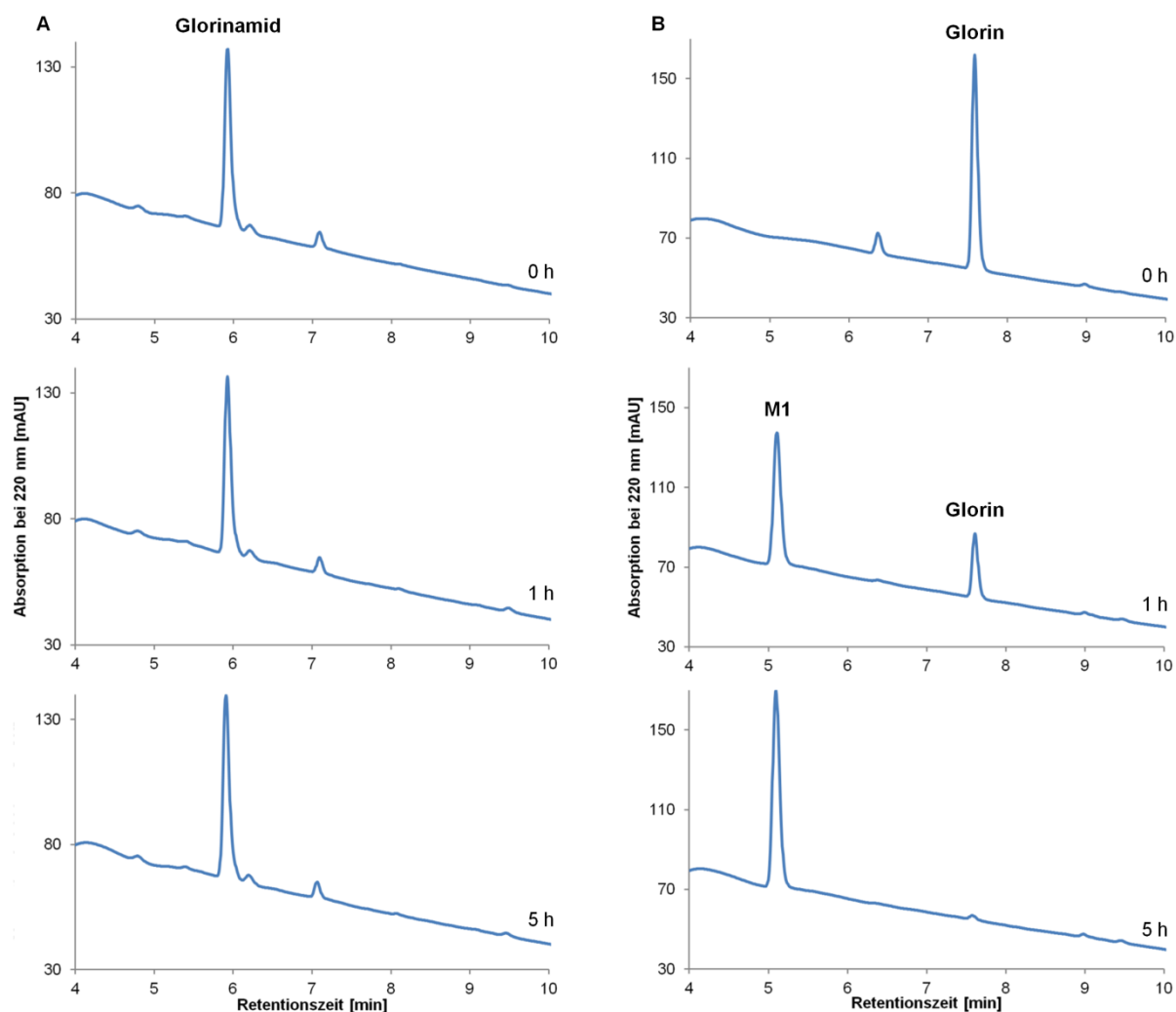


Abbildung 22: Glorinase-Assay mit Glorinamid (A) oder Glorin (B) als Substrat. Wegen der Löslichkeit von Glorinamid wurden alle Reaktionsansätze zusätzlich mit 2 % DMSO versetzt. Glorin wurde klassisch abgebaut. Glorinamid war innerhalb von 5 h Reaktionszeit stabil gegenüber dem enzymatischen Abbau.

### 3.3 Biologische Aktivität von M1 und Glorinamid

Glorin besitzt zwei bislang beschriebene biologische Aktivitäten in *P. pallidum* [46]: Zum einen sorgt ein Gloringradient für eine Chemotaxis der Zellen in Richtung der höheren Glorinkonzentration und zum anderen ist Glorin für die Regulation einer Gruppe von Genen in *P. pallidum* während der frühen Aggregation verantwortlich. Die Glorinase ist als das Enzym definiert, welches das aktive Glorinsignal abbaut. Deswegen sollte untersucht werden, ob **M1** eine der oben genannten biologischen Aktivitäten besitzt. Ist **M1** biologisch inaktiv, ist das Enzym, welches den Abbau von Glorin zu **M1** katalysiert, die Glorinase. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Glorinamid genregulatorisch aktiv ist.

Die genregulatorischen Eigenschaften von **M1** und Glorinamid wurden mit dem Test auf Induktion von zwei glorininduzierten Markergenen bestimmt. Die Eigenschaft von Glorin und **M1**, die Chemotaxis von *P. pallidum* zu vermitteln, wurde mithilfe eines Chemotaxis-Tests in der Insall-Chamber [75] ermittelt.

#### 3.3.1 Expression von glorininduzierten Markergenen

Um die genregulatorischen Eigenschaften von Glorin, **M1** und Glorinamid zu überprüfen, wurden zwei glorininduzierte Gene, *PPL\_09347* und *PPL\_05354* [46] als Modellgene ausgesucht. *PPL\_09347* codiert für ein Ortholog von Profilin aus *D. discoideum* und *PPL\_05354* codiert vermutlich für ein Protein der extrazellulären Matrix. Zellen von *P. pallidum* wurden 1 h bei 100 rpm und 22 °C inkubiert, gefolgt von der zweimaligen Zugabe von Wasser (Kontrolle) sowie 1 µM Glorin, **M1** oder Glorinamid im Abstand von 30 min. Nach weiteren 30 min Inkubation wurden jeweils 10<sup>7</sup> Zellen geerntet, um danach von diesen Zellen RNA zu extrahieren und cDNA zu produzieren. Die differentielle Genexpression von *PPL\_09347* und *PPL\_05354* wurde dann mit RT-qPCR bestimmt. Bezogen wurde die Expression der Markergene auf das GAPDH-Gen.

Bei dem Gen *PPL\_09347* zeigte sich, wie erwartet, eine hungerinduzierte Hochregulierung der Gene bereits in der Kontrolle (Wasser). Diese Kontrolle wies eine 15-fache Hochregulierung von *PPL\_09347* im Vergleich zu vegetativen Zellen auf. Die Glorinpulse steigerten diesen Wert um das 12-Fache auf 185,9. Bei **M1** gepulsten Zellen lag der Wert mit 22,4 etwa 1,5-fach über der Kontrolle, aber die Statistik ( $p = 0,42$ )



deutet darauf hin, dass dieser Wert durch Hungerinduktion wie bei der Kontrolle und nicht durch **M1** zustande kam (Abbildung 23). Die Werte für das Gen *PPL\_05354* ergaben ein ähnliches Bild. Die Kontrolle zeigte eine hungerinduzierte 18-fache Hochregulierung des Gens an. Glorin steigerte diesen Wert um das 18-Fache auf 329. Bei **M1** lag das Gen mit 54,9 ca. 3-fach über der Kontrolle, aber auch hier deutet die Statistik ( $p = 0,22$ ) darauf hin, dass dieser Wert durch Hungerinduktion und nicht durch **M1** zustande kam (Abbildung 23). Somit lässt sich sagen, dass **M1** keine glorinähnliche genregulatorische Eigenschaft bezüglich der zwei Markergene *PPL\_09347* und *PPL\_05354* besitzt.

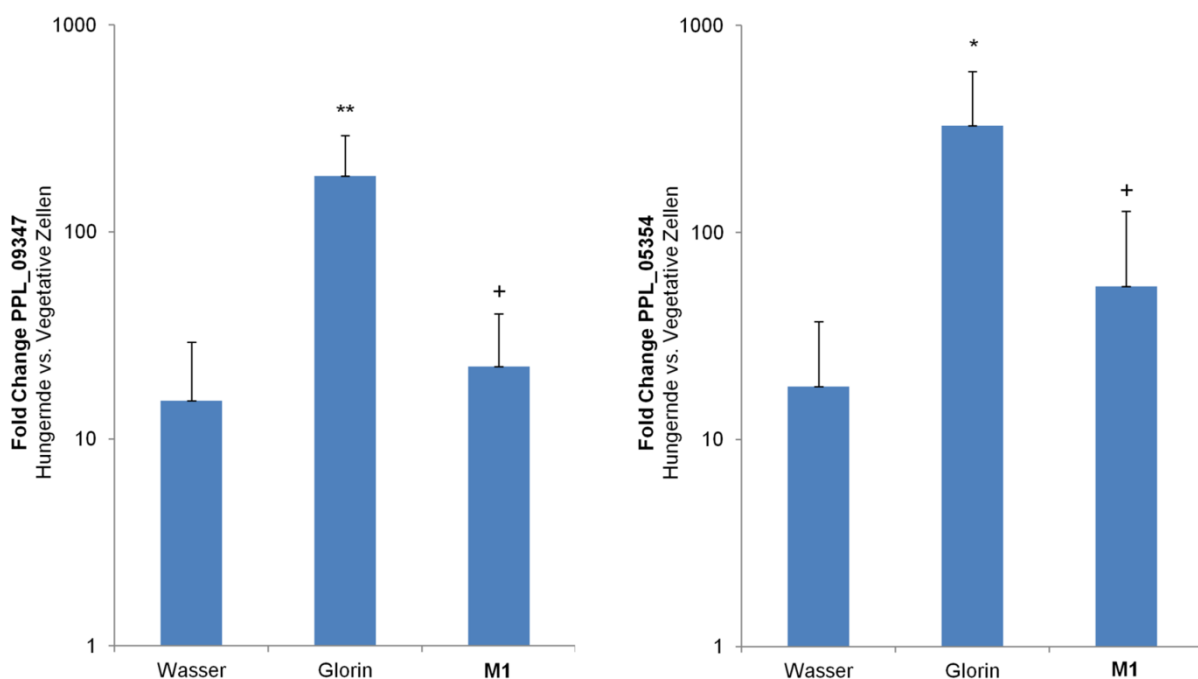


Abbildung 23: RT-qPCR zweier glorininduzierter Gene nachdem hungernde Zellen von *P. pallidum* mit 2x Wasser, 1  $\mu$ M Glorin oder 1  $\mu$ M M1 gepulst wurden. Angegeben ist der Fold Change: Genexpression (mRNA) von hungernden Zellen gegen vegetative Zellen. Die angegebenen Daten sind MW+SD aus 8 biologischen Replikaten. Studentverteilung gegen Zellen mit Wasser gepulst: +  $p > 0,05$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Beim Test der geninduzierenden Eigenschaft von Glorinamid zeigte sich zunächst wieder die erwartete Hungerinduktion von *PPL\_09347*. In der Kontrolle (Wasser) war das Gen 17,6-fach hochreguliert im Vergleich zu vegetativen Zellen. Glorin, das in diesem Experiment als Vergleich diente, steigerte diesen Wert um das ca. 17-Fache auf 291,3. Bei Verwendung von Glorinamid war das Gen im Vergleich zur Kontrolle ca. 26-fach und zu vegetativen Zellen ca. 438-fach hochreguliert (Abbildung 24). Somit besitzt Glorinamid, trotz der Amidbindung ähnliche genregulatorische Eigenschaften für das Markergen *PPL\_09347* wie Glorin und ist wahrscheinlich ein Glorinrezeptor-Agonist.

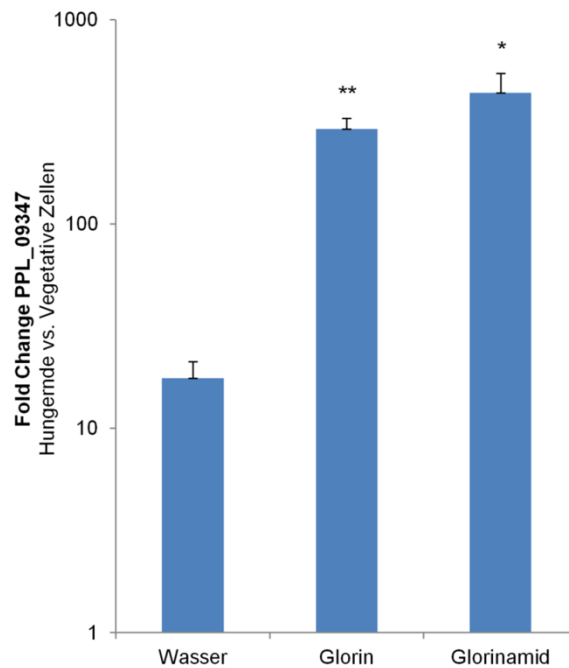


Abbildung 24: RT-qPCR des glorininduzierten Gens *PPL\_09347*, nachdem hungernde Zellen von *P. pallidum* mit 2x Wasser, Glorin oder Glorinamid gepulst wurden. Angegeben ist der Fold Change: Genexpression (mRNA) von hungernden Zellen gegen vegetative Zellen. Die angegebenen Daten sind MW+SA aus 3 biologischen Replikaten. Studentverteilung gegen Zellen mit Wasser gepulst: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.3.2 Chemotaxis-Assay mit Glorin und M1

Die chemotaktischen Eigenschaften von Glorin und **M1** wurden mit der Insall-Chamber bestimmt (Abbildung 25). Bei dieser gab es ein inneres Pufferreservoir mit 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 und einen äußeren Pufferkanal mit 100 nM Testsubstanz in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 getrennt durch eine Brücke (rote Rechtecke in Abbildung 25). Über diese Brücke konnte sich nun ein stabiler Gradient der Testsubstanz (Glorin oder **M1**) von 0 auf 100 nM ausbilden. Die Zellen von *P. pallidum* wurden nun mit einem Deckgläschen auf die Insall-Chamber gesetzt und 30 min mit einem Mikroskop beobachtet. Dabei wurde alle 20 s ein Bild aufgenommen. Wenn die Zellen auf den Gradienten chemotaktisch reagierten, ließ sich eine gerichtete Bewegung der meisten Zellen in Richtung der höheren Glorinkonzentration beobachten. Ansonsten zeigten sich nur zufällige Bewegungen ohne konkrete Ausrichtung. Einzelne Zellen wurden über 30 min mit einer Tracking Software verfolgt. Anhand der Tracking-Daten wurde ein Rose-Plot berechnet um die Verteilung der bevorzugten Bewegungsrichtungen darzustellen.

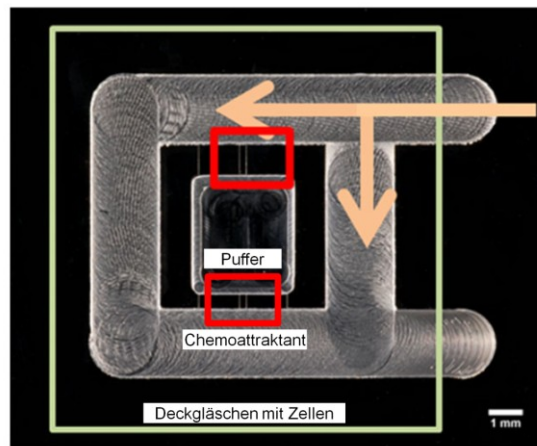


Abbildung 25: Foto von der Insall-Chamber. Das große Quadrat zeigt die Position des Deckgläschens mit Zellen auf der Unterseite. Die Pfeile markieren den Kanal für die Chemoattraktantlösung. In der Mitte befindet sich ein Pufferreservoir. Zwischen Pufferreservoir und Kanal bildet sich ein stabiler Gradient von der in der Chemoattraktantlösung enthaltenen Verbindung aus. Die roten Rechtecke zeigen den Beobachtungsbereich. Abbildung modifiziert nach [78].

Der Assay zeigte, dass sich die meisten Zellen in einem Gradienten von 0-100 nM Glorin in Richtung der größeren Glorinkonzentration bewegten. Somit konnte in diesem Experiment erstmalig ermittelt werden, dass *P. pallidum*-Zellen chemotaktisch auf Glorin reagieren. In einem Gradienten von 0-100 nM **M1** zeigte *P. pallidum* nur zufällige Bewegungen (Abbildung 26). Somit war **M1** chemotaktisch inaktiv und besitzt demnach keine glorinähnliche Eigenschaft.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass **M1** sowohl hinsichtlich der Regulation von Markergenen als auch als Chemoattraktant inaktiv ist. Somit ist das Enzym, das die Hydrolyse von Glorin zu **M1** katalysiert, per Definition als Glorinase zu bezeichnen.

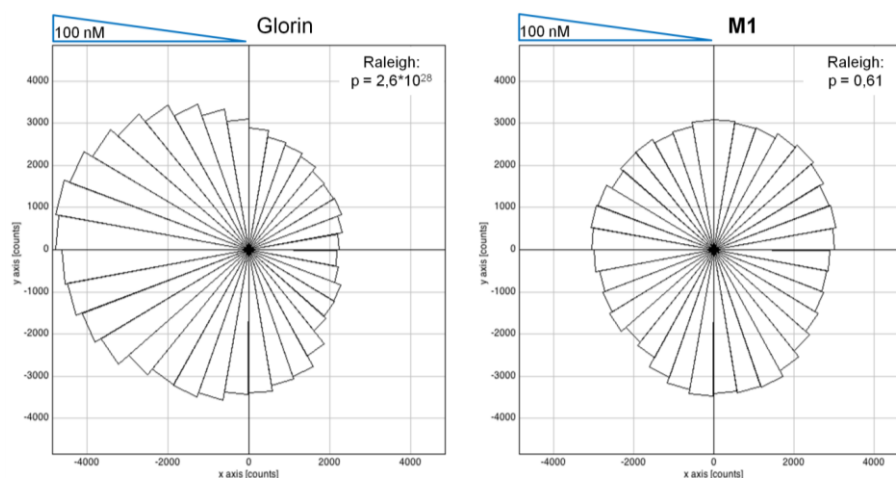


Abbildung 26: Rose Plot des Insall-Chamber-Assays von *P. pallidum* mit einem Gradienten von 0-100 nM von Glorin oder M1. Bei Glorin gab es eine gerichtete Bewegung der Zellen in Richtung der größeren Glorinkonzentration. Bei M1 erfolgte keine gerichtete Bewegung der Zellen und somit war M1 chemotaktisch inaktiv. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

### 3.4 Temperaturoptimum und Inhibition der Glorinase

Im Folgenden sollten charakteristische Eigenschaften der Glorinase im Überstand von *P. pallidum* untersucht werden. Es wurde beispielsweise das Temperaturoptimum ermittelt und es sollte versucht werden, einen Glorinase-Inhibitor zu identifizieren. Dies war deshalb von Interesse, weil die Degradation von Glorin im Medium gegebenenfalls unterbunden und somit Glorin angereichert und detektiert werden könnte. Tatsächlich wurde die Sekretion von Glorin, bis auf *P. violaceum*, bisher für keine soziale Amöbe gezeigt.

#### 3.4.1 Temperaturoptimum der löslichen Glorinaseaktivität

Die optimale Kultivierungstemperatur der sozialen Amöben und auch von *P. pallidum* ist 22 °C. Es sollte überprüft werden, wo das Temperaturoptimum der sekretierten Glorinase liegt. Dafür wurde der Überstand so verdünnt, dass ein Glorinumsatz bei 22 °C und 30 min Reaktionszeit ca. 50 % betrug. Dann erfolgten mit diesem Ansatz Glorinase-Assays bei 15-55 °C.

Die Glorinase konnte bei 15 °C 49,8 %, bei 25 °C 53,9 %, bei 35 °C 64,4 %, bei 45 °C 67,6 %, bei 50 °C 45,8 % und bei 55 °C 9,1 % Glorin umsetzen (Abbildung 27). Somit stieg die Glorinaseaktivität von 15 °C bis auf 45 °C und fiel danach rapide ab. Das Temperaturoptimum der sekretierten Glorinase lag demnach bei 45 °C, also recht weit entfernt von der optimalen Wachstumstemperatur.

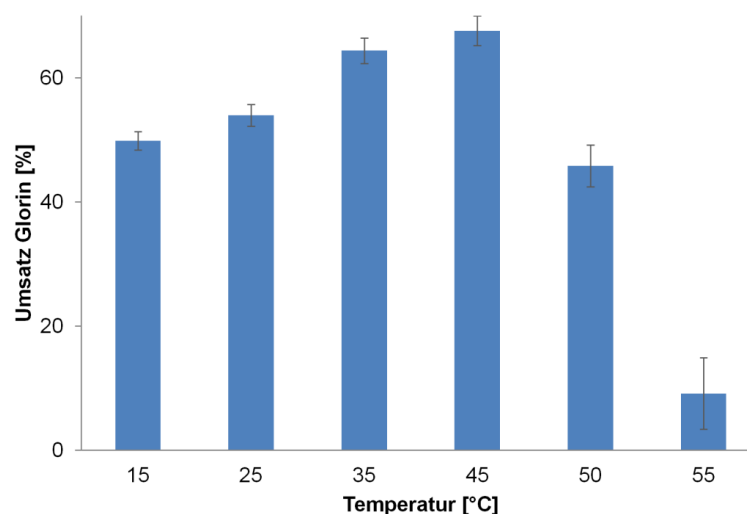


Abbildung 27: Bestimmung des Temperaturoptimums der Glorinase. Der Glorinase-Assay fand bei den angegebenen Temperaturen für 30 min statt. Danach erfolgte eine Hitzeinaktivierung bei 95 °C für 10 min.

### 3.4.2 Inhibition der Glorinase durch Lactamringanaloga und Glorinamid

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Glorinase durch strukturähnliche Verbindungen gehemmt werden kann. Dafür wurde der Lactamring als wichtiges Erkennungs- und Bindeeinheit im aktiven Zentrum der Glorinase angenommen. Deswegen wurden Verbindungen ausgesucht, die einen Lactamring oder eine Cyclohexaneinheit beinhalten. Für die Inhibitionsuntersuchung wurden ausgewählt: 1.S-(+)-3-Aminopiperidin (CAS-Nr.: 334618-07-4), 2. S-3-Amino-2-piperidon (CAS-Nr.: 1272756-20-3), 3. 2-Aminocyclohexanon (CAS-Nr.: 6946-05-0; Abbildung 28).

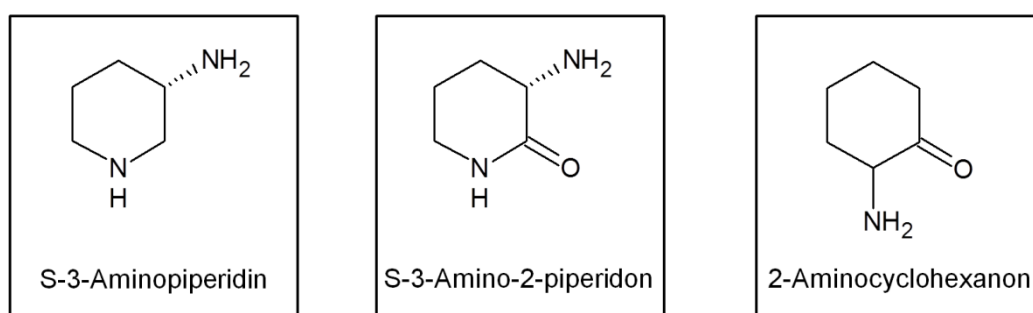
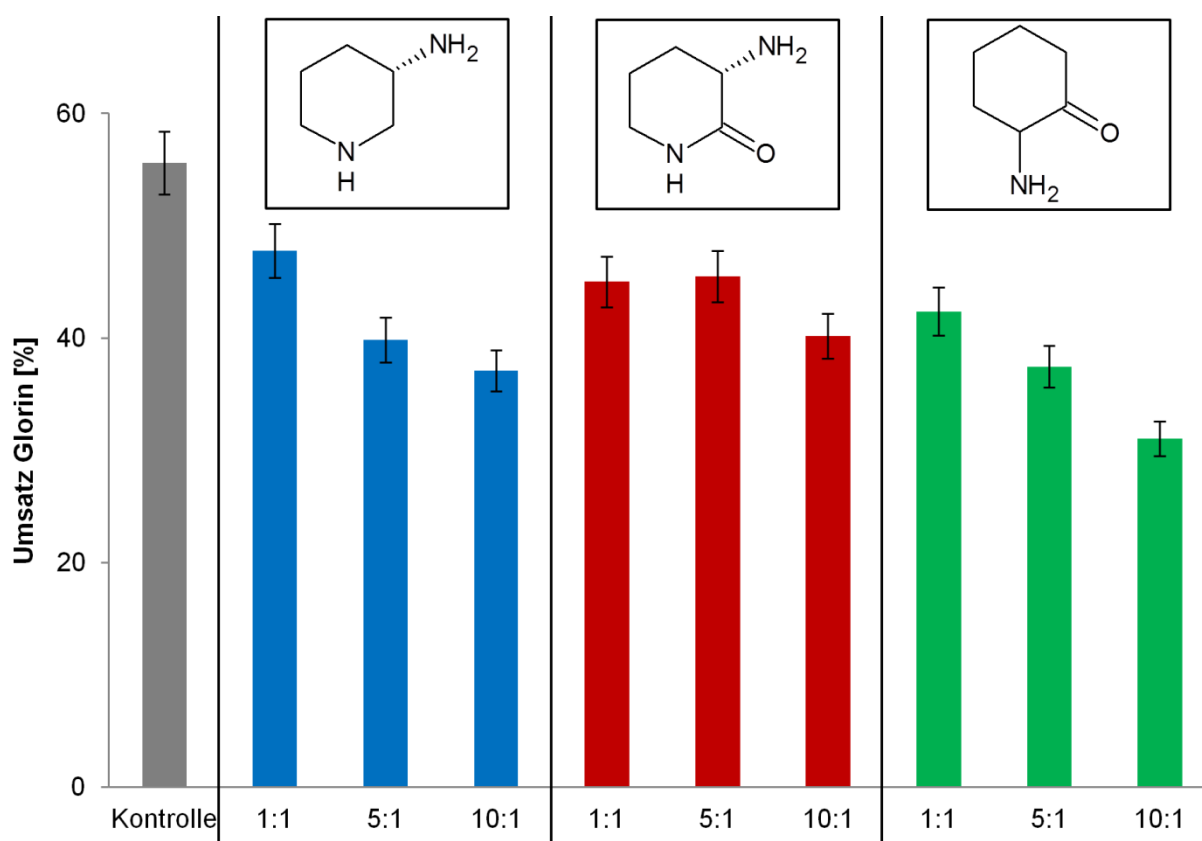


Abbildung 28: Strukturen von S-3-Aminopiperidin, S-3-Amino-2-piperidon, 2-Aminocyclohexanon

Glorin als Substrat wurde wie üblich mit 300  $\mu$ M eingesetzt. Die vermuteten Inhibitoren wurden in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt: 0,3 mM (1:1 zur eingesetzten Glorinkonzentration), 1,5 mM (5:1) und 3 mM (10:1). Der glorinasehaltige Überstand wurde so verdünnt, dass ohne Hemmung ein Glorinumsatz von ca. 50 % zu erwarten war. Vor der Zugabe von Glorin wurden die Proben 5 min mit den Inhibitor bei 22 °C inkubiert. Anschließend wurden 300  $\mu$ M Glorin zugegeben und 30 min bei 22 °C inkubiert.

Die ungehemmte Glorinase konnte 55,6 % des Glorins umsetzen. Durch die Zugabe von S-(+)-3-Aminopiperidin konnte die Glorinase bei einfacher Inhibitorkonzentration (1:1) 47,8 %, bei fünffacher Konzentration (5:1) 39,8 % und bei zehnfacher (10:1) Konzentration 37,8 % Glorin umsetzen. S-3-Amino-2-piperidon konnte bei einfacher Konzentration 45,0 %, bei fünffacher Konzentration 45,5 % und bei zehnfacher Konzentration 40,2 % Glorin abbauen. 2-Aminocyclohexanon konnte bei einfacher Konzentration 42,4 %, bei fünffacher Konzentration 37,5 % und bei zehnfacher Konzentration 31,0 % Glorin degradieren (Abbildung 29). Alle drei vermuteten Inhibitoren waren in der Lage, den Abbau von Glorin zu reduzieren und somit die

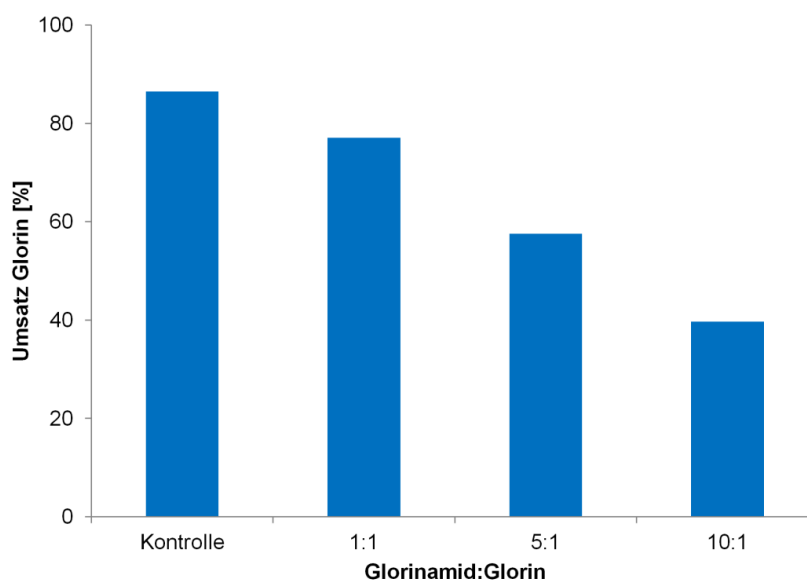
Glorinase zu inhibieren. Bei allen drei Substanzen ließ sich auch eine konzentrationsabhängige Zunahme der Inhibierung beobachten. Der stärkste der drei getesteten Inhibitoren war 2-Aminocyclohexanon. Diese Verbindung konnte, bei zehnfachem Überschuss zum Glorin, den Glorinumsatz um 44,2 % senken. Somit war keiner der getesteten Lactamringanaloga in der Lage, die Glorinase komplett zu hemmen. Aufgrund der unvollständigen Hemmung erwiesen sich die Substanzen als ungeeignet für die Anreicherung von sekretiertem Glorin in Überständen aggregierender *P. pallidum*-Zellen.



**Abbildung 29:** Inhibition der sekretierten Glorinase durch S-(+)-3-Aminopiperidin, S-3-Amino-2-piperidon und 2-Aminocyclohexanon. Es wurden 300  $\mu$ M Glorin als Substrat eingesetzt. Die Inhibitoren wurden mit 0,3 mM (1:1), 1,5 mM (5:1) und 3 mM (10:1) eingesetzt. Der Überstand wurde vor der Zugabe von Glorin 5 min mit dem vermuteten Inhibitor bei 22 °C inkubiert. Die Reaktionszeit betrug 30 min. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SA eines Experiments, welches als jeweilige Dreifachbestimmung parallel durchgeführt wurde.

Glorinamid ist ein Strukturanalogon von Glorin und besitzt, wie oben gezeigt, glorinähnliche genregulatorische Eigenschaften. Glorinamid bindet somit am Glorinrezeptor, wurde aber von der Glorinase nicht hydrolytisch abgebaut. Glorinamid könnte deshalb ein kompetitiver Inhibitor der Glorinase sein, was im Folgenden untersucht werden sollte. Auch in diesem Test wurden einfacher (0,3 mM), fünffacher (1,5 mM) und zehnfacher (3 mM) Überschuss von Glorinamid zu Glorin verwendet. Vor der Glorinzugabe wurde der Überstand fünf Minuten mit Glorinamid bei 22 °C inkubiert.

Die Glorinase setzte ohne Anwesenheit von Glorinamid 86,5 % des Glorins um. Bei gleicher Konzentration von Glorin und Glorinamid konnte die Glorinase 77,1 %, bei fünffachem Überschuss an Glorinamid 57,1 % und bei zehnfachem Überschuss 39,7 % des Glorins abbauen. Es ließ sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Glorinase beobachten. Bei zehnfachem Überschuss von Glorinamid sank der Umsatz von Glorin um 54,1 %. Da sich in der Einfachmessung Glorinamid nicht als potenter Inhibitor der Glorinase zeigte, wurde dieser Ansatz, die Nutzung von Glorinamid zur Anreicherung von Glorin in Überständen aggregierender *P. pallidum*-Zellen, nicht weiter verfolgt.



**Abbildung 30: Inhibition der sekretierten Glorinase durch Glorinamid.** Es wurden 0,3 mM Glorin als Substrat genutzt. Glorinamid als möglicher Inhibitor wurde mit 0 (ohne Inhibitor), 0,3 mM (1:1), 1,5 mM (5:1) und 3 mM (10:1) eingesetzt. Der Überstand wurde vor Zugabe von Glorin 5 min mit Glorinamid bei 22 °C inkubiert. Die Reaktionszeit betrug 30 min. Die gezeigten Daten sind Einzelwerte eines Experiments.

### 3.4.3 Inhibition der Glorinase durch Proteaseinhibitoren

Da Carboxylesterasen und manche Proteasen einen ähnlichen Mechanismus der Hydrolyse der Ester- oder Peptidbindung (katalytische Triade mit Serin oder Cystein als Nucleophil) aufweisen [79], sollte untersucht werden, ob Proteaseinhibitoren die Glorinase hemmen können. Dabei wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Proteaseinhibitoren mit den angegebenen Arbeitskonzentrationen eingesetzt. Der Überstand wurde so verdünnt, dass ohne Hemmung ein Umsatz von Glorin von ca. 50 % zu erwarten war. Der Proteaseinhibitor wurde 5 min vor Glorin zum Überstand hinzugegeben.

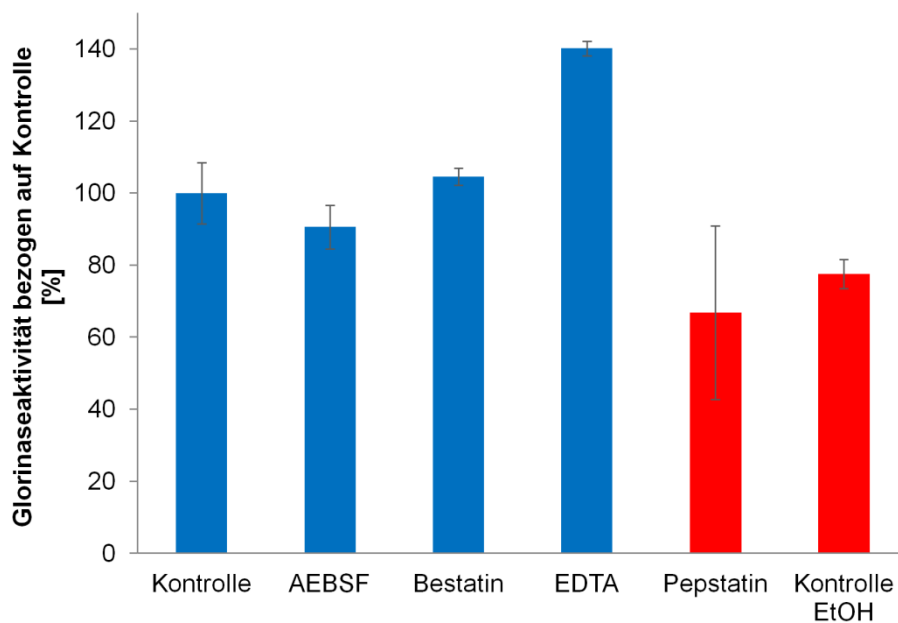
**Tabelle 7: Proteaseinhibitoren, die auf ihre Eigenschaft die Glorinase, zu hemmen untersucht wurden, die verwendete Konzentration und die inhibierten Proteaseklassen.**

<b>Proteaseinhibitor</b>	<b>Arbeitskonzentration</b>	<b>Inhibierte Protease*</b>
AEBSF	0,5 mM	Serin-Proteasen
Bestatin	10 $\mu$ M	Aminopeptidasen
Pepstatin	10 $\mu$ M	Saure Proteasen
EDTA	0,5 M	Metallo-Proteasen

\*Angaben des Lieferanten Sigma-Aldrich, [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)



Die Glorinase setzte ohne Proteaseinhibitoren 43,4 % des Glorins um. Dieser Wert wurde als 100-prozentige Glorinaseaktivität angenommen und die anderen Proben wurden darauf bezogen. Bei Zugabe von AEBSF betrug die Glorinaseaktivität 90,6 %, bei Bestatin 104,6 % und bei EDTA 140,1 %. Die Glorinaseaktivität erreichte bei 1 % Ethanol in Lösung (Kontrolle mit EtOH) 77,6 %. Mit Pepstatin und 1 % Ethanol in Lösung lag die Glorinaseaktivität bei 66,8 % (Abbildung 31). Keiner der hier getesteten Proteaseinhibitoren konnte die Glorinase wirkungsvoll hemmen. Bei Zugabe von EDTA kam es sogar zu einer Steigerung des Glorinumsatzes von 40 %.



**Abbildung 31: Hemmung der Glorinaseaktivität durch Proteaseinhibitoren. Der Umsatz der Proben wurde auf die Kontrolle bezogen.**

### 3.5 Revidiertes Metabolismusmodell von Glorin

Nach De Wit et al. wurde Glorin durch *P. violaceum* über die Hydrolyse des Lactamrings zu **M3** degradiert und so inaktiviert. Parallel dazu gab es eine zweite, deutlich schwächere Aktivität, bei der die Propionsäure abgespalten wurde und so **M4** entstand [48]. Ausgehend von den hier gezeigten Ergebnissen zeigte sich aber, dass Glorin von *P. pallidum* durch die hydrolytische Spaltung des Carboxylesters degradiert wurde. Nach längeren Reaktionszeiten wurde ein zweiter Metabolit **M2** detektiert, der durch die hydrolytische Abspaltung der Propionsäure von **M1** entstand (Abbildung 32). Des Weiteren konnte Glorinamid trotz glorinähnlicher biologischer Aktivität nicht zu **M1** oder zu dem Amidanalogon von **M3** degradiert werden, was die Bildung von **M1** aus Glorin bestätigt. **M1** wiederum zeigte keine glorinähnliche biologische Aktivität, was das Enzym, welches den Abbau von Glorin zu **M1** katalysiert als Glorinase identifiziert.

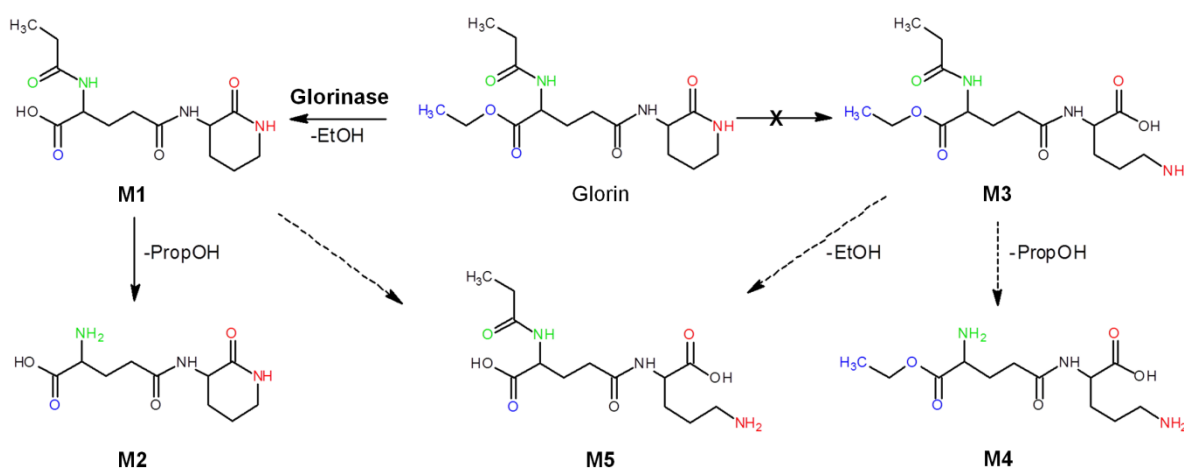


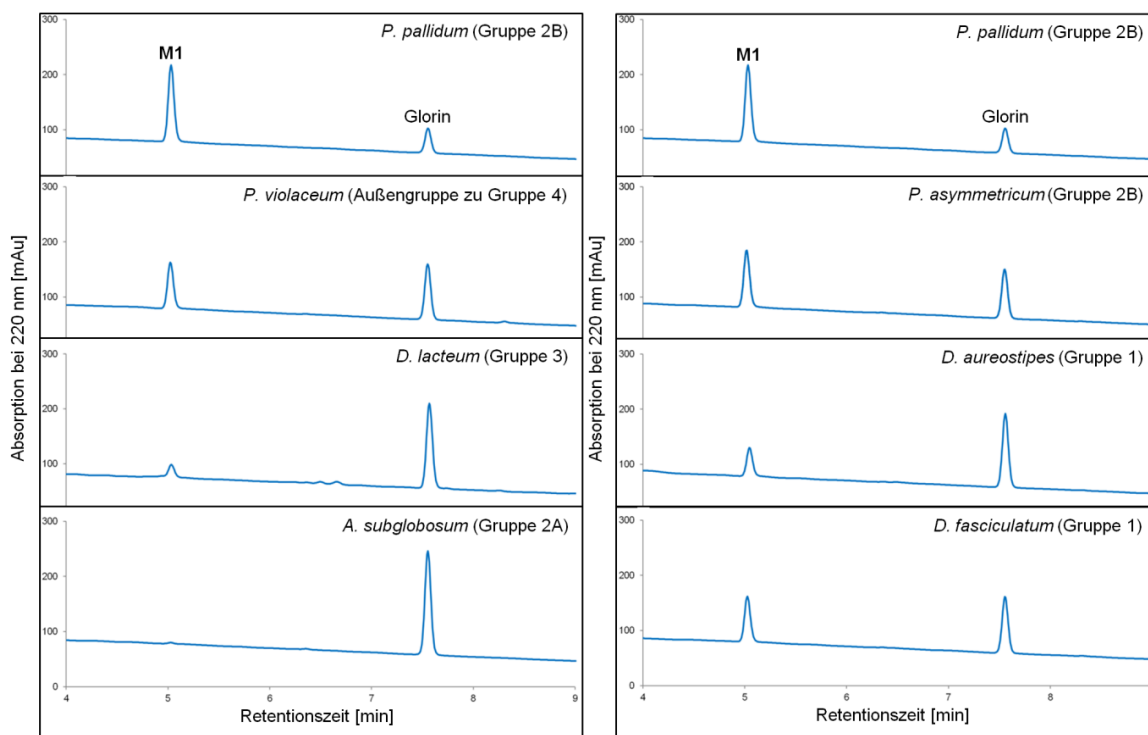
Abbildung 32: Metabolismus von Glorin durch *Polysphondylium pallidum*. Glorin wurde durch hydrolytische Abspaltung von Ethanol zu **M1**. **M1** wurde bei längeren Reaktionszeiten durch hydrolytische Abspaltung von Propionsäure zu **M2** abgebaut. Die Metaboliten **M3** und **M4** wurden von De Wit als Degradationsprodukte von Glorin postuliert [48].

### 3.6 Glorinaseaktivität in anderen Dictyosteliden

Gegen das hier gezeigte Metabolismusmodell von Glorin von *P. pallidum* ließe sich einwenden, dass De Wit et al. den Metabolismus von Glorin durch *P. violaceum* [48] und nicht *P. pallidum* untersucht haben und Glorin durch *P. violaceum* anders inaktiviert werden könnte. Deswegen wurde der Metabolismus von Glorin durch Dictyosteliden aus den Gruppen 1, 2, 3 und insbesondere in *P. violaceum* untersucht. Als Vertreter für die Gruppe 1 wurden *D. fasciculatum* und *D. aureostipes*, für die Gruppe 2 *P. pallidum* (2B), *P. asymmetricum* (2B) und *Acytostelium subglobosum* (2A) und für die Gruppe 3

*D. lacteum* ausgesucht. *P. violaceum* ist phylogenetisch eine Außengruppe zu Gruppe-4-Amöben [13]. Die Amöben wurden auf Bakterien kultiviert und nach der Ernte in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 bei 100 rpm und 22 °C inkubiert. Nach 1, 2 und 4 h wurde zellfreier Überstand entnommen und ein Glorinase-Assay bei 22 ° mit 30 min Reaktionszeit durchgeführt.

Der Überstand von *P. violaceum* setzte Glorin zu einem Metaboliten um, der auf einer C18-Säule dieselbe Retentionszeit besaß wie **M1** von *P. pallidum* (Abbildung 33). Der  $[M+H]^+$  bei einem  $m/z$  von 300,1548 entsprach dem von **M1** (siehe Anhang). Somit besaß *P. violaceum*, unter den hier getesteten Assaybedingungen, denselben Glorinmetabolismus wie *P. pallidum*. Bei den anderen getesteten Vertretern der sozialen Amöben der Gruppen 1, 2 und 3 zeigte der Überstand auch denselben Glorinmetabolismus wie *P. pallidum*, einen Metaboliten mit derselben Retentionszeit wie *P. pallidum* **M1** mit einem  $[M+H]^+$  von 300,1547. Einzig *A. subglobosum* wies keine Bildung des Metabolitpeaks **M1** auf (Abbildung 33). Das Ergebnis legt nahe, dass der Glorinmetabolismus von *P. pallidum* in der monophyletischen Gruppe der Dictyosteliden weit verbreitet ist.



**Abbildung 33:** Vergleich des Glorinmetabolismus in Dictyosteliden. Es wurden Vertreter der phylogenetischen Gruppen 1-3 der sozialen Amöben ausgewählt. Die Amöben wurden auf Bakterien kultiviert und nach der Ernte für 1-4 h in 17 mM Phosphatpuffer bei 100 rpm und 22 °C inkubiert. Der zellfreie Überstand wurde mit 300 µM Glorin versetzt und 30 min bei 22 °V inkubiert. Die hitzeinaktivierten Proben wurden mittels HPLC analysiert.

### 3.7 Sekretom von *Polysphondylium pallidum*

Um einen Überblick über die von *P. pallidum* während der Hungerphase sekretierten Proteine zu erhalten, wurden zellfreie Überstände mit proteinbiochemischen Methoden analysiert. Zunächst wurden 40-100 µg Gesamtprotein aus einer 4 h- Schüttelkultur von *P. pallidum* auf einem 12,5 % SDS-Gel aufgetrennt um die darin enthaltenen Proteine per MALDI-TOF zu analysieren. Der tryptische Verdau der in den Gelbanden vorhandenen Proteine und die MALDI-TOF-Messungen wurden von Till Kindel in der Arbeitsgruppe von Olaf Kniemeyer am Hans-Knöll-Institut Jena durchgeführt und ausgewertet.

Abbildung 34 zeigt ein typisches SDS-Gel nach Auftrennung und Färbung von 40-100 µg Gesamtprotein aus Überständen aggregierender Amöben. Bande 3 bei ca. 70 kDa und Bande 12 unterhalb von 25 kDa waren die deutlichsten Banden und sind bereits bei 40 µg Gesamtprotein deutlich zu sehen. Die Bande 1 und 2 waren erst bei 100 µg Gesamtproteingehalt klar zu erkennen.

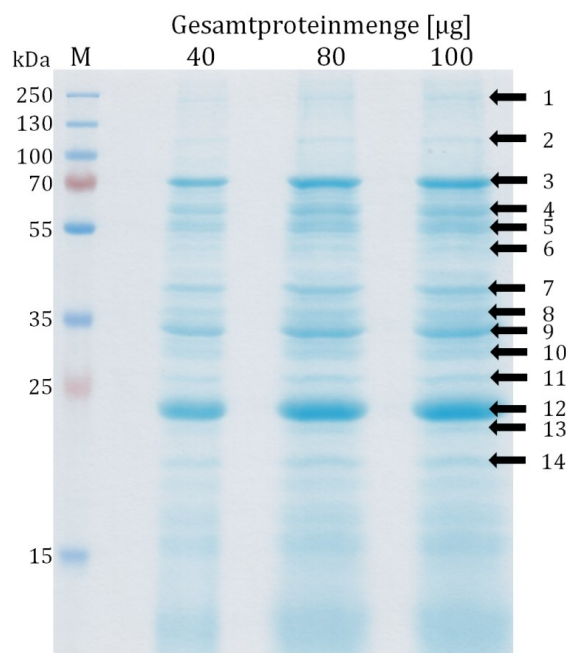


Abbildung 34: 12,5 % SDS-Gel von 40-100 µg Gesamtprotein einer 4 h-Schüttelkultur von *P. pallidum*. Bande 1-14 wurden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und per MALDI-TOF analysiert.

Tabelle 8 zeigt die in den Gelbanden identifizierten Proteine, durch tryptischen Verdau der Banden und MALDI-TOF-Analyse. In unterschiedlichen Banden wurden teilweise dieselben Proteinkandidaten gefunden. So wurde in Gelbande 3 und 4 PPL\_09750, in Bande 5 und 6 PPL\_08803 und in Bande 12 und 13 PPL\_00588 identifiziert. In Bande 10 wurden zwei Proteine ermittelt. Trotz deutlicher Bande im SDS-Gel konnte in Bande 9

kein Protein entdeckt werden. Es wurden verschiedene Proteinfunktionen gefunden. In Bande 1 konnte ein Protein mit einer Von-Willebrand-Faktor-Domäne und in Bande 2 ein Lipoprotein identifiziert werden. Bande 3 enthielt eine Aminooxidase. Die Glorinase gehört der Reaktion nach erwartungsgemäß zu den Hydrolasen. Proteine mit einer solchen Enzymaktivität konnten in Bande 7 (Cathepsin D), Bande 11 (Chitinase) und Bande 14 (Cysteinproteinase 5) identifiziert werden. Cathepsin D (E.C. 3.4.23.5) ist eine Endopeptidase und hydrolysiert Peptidbindungen, Chitinase (E.C. 3.2.1.14) hydrolysiert das Polysaccharid Chitin und Cysteinproteinase 5 (E.C. 3.4.22.35) hydrolysiert Peptidbindungen nach einem Arg-Arg-Motiv [80]. Die Glorinase gehört den hier gezeigten Ergebnissen zufolge zu den Carboxylesterasen (E.C. 3.1.1.1). Es konnte also zunächst kein Glorinasekandidat direkt identifiziert werden. Somit empfahl es sich, den Überstand zu fraktionieren und dann anhand einer aktivitätsabhängigen (Glorinabbau) Bandenintensität auf einem SDS-Gel die Glorinase enthaltende Gelbande vor der MS-Analyse zu identifizieren.

**Tabelle 8: Identifizierte Proteine, ihr Molekulargewicht und vermutete Proteinfunktion**

Bande	Eintragsnummer*	MW** [kDa]	Vermutete Proteinfunktion***
1	PPL_11490	153,3	Typ A Von-Willebrand-Faktor-Domäne enthaltendes Protein
2	PPL_10392	71,2	Lipoprotein
3	PPL_09750	69,2	Aminooxidase
4	PPL_09750	69,2	Aminooxidase
5	PPL_08803	55,0	Aldehyddehydrogenase
6	PPL_08803	55,0	Aldehyddehydrogenase
7	PPL_05209	41,6	Cathepsin D
8	PPL_03967	33,0	Cathepsin-Z-Vorstufe
9	/	/	/
10	PPL_03474	57,9	Annexin VII (aa 219-531 = 40,9 kDA)
10	PPL_10277	30,8	hypothetisches Protein
11	PPL_04308	59,1	Chitinase
12	PPL_00588	24,1	Nucleosiddeaminase
13	PPL_00588	24,1	Nucleosiddeaminase
14	PPL_11857	36,9	Vorstufe Cysteinproteinase 5

\*aus Proteom von SACGB-Datenbank, <http://sacgb.leibniz-flf.de/cgi/index.pl?ssi=free>

\*\* theoretisches Molekulargewicht anhand der Primärsequenz

\*\*\* ermittelt mit Blast-Tool und der Conserved Domains Datenbank des NCBI [81, 82]

### 3.8 Fraktionierung von glorinasehaltigen Überständen

Um die Glorinase aus Überständen von *P. pallidum* PN500 zu identifizieren, wurden glorinasehaltige Überstände (Hungerzeit 4-5 h) mit verschiedenen Methoden fraktioniert. Es wurden die Affinitätschromatographie an Concanavalin A, Ultrafiltration, Größenausschluss- und Anionenaustauschchromatographie angewendet. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend auf ihre Glorinaseaktivität untersucht. Die Proteine in den Fraktionen um die Peakfraktion wurden mittels SDS-PAGE analysiert, um eine Aktivitäts-Banden-Korrelation herzustellen. Banden, die eine starke Korrelation zur Glorinaseaktivität aufwiesen, wurden ausgeschnitten und weiter proteomisch analysiert. Die Proteomik wurde entweder von Bernhard Schlott in der Arbeitsgruppe Große am FLI-Leibniz-Institut Jena oder von Daniel Abegg in der Arbeitsgruppe Adibekian an der Universität in Genf (jetzt Scripps-Institut Florida) durchgeführt und ausgewertet.

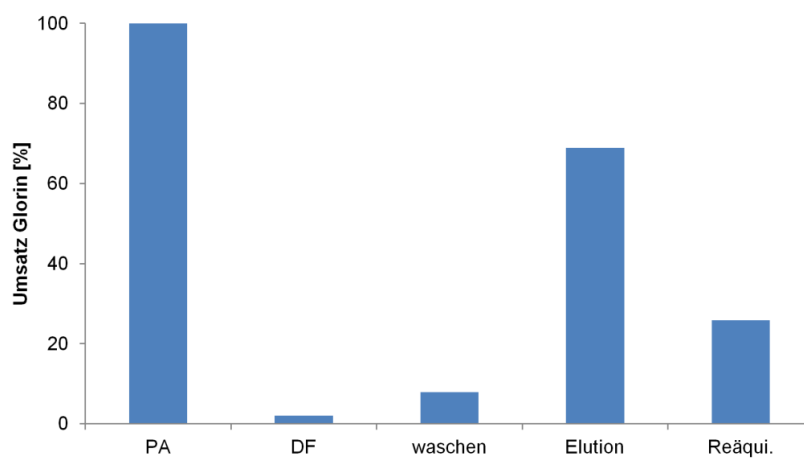
#### 3.8.1 Concanavalin-A-Chromatographie

Concanavalin A (Con-A) ist ein Lektin aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) und in der Lage, an Glykoproteine mit Mannosyl- oder Glycosyl-Resten zu binden [83]. Gebunden an Sepharose (Concanavalin A-Sepharose® 4B, Sigma-Aldrich) und gepackt als Säule ergibt sich eine elegante Möglichkeit, glykosylierte Proteine von nicht-glykosylierten Proteinen zu trennen. Die Elution der glykosylierten Proteine erfolgt dann mittels Zugabe von Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid im Elutionspuffer.

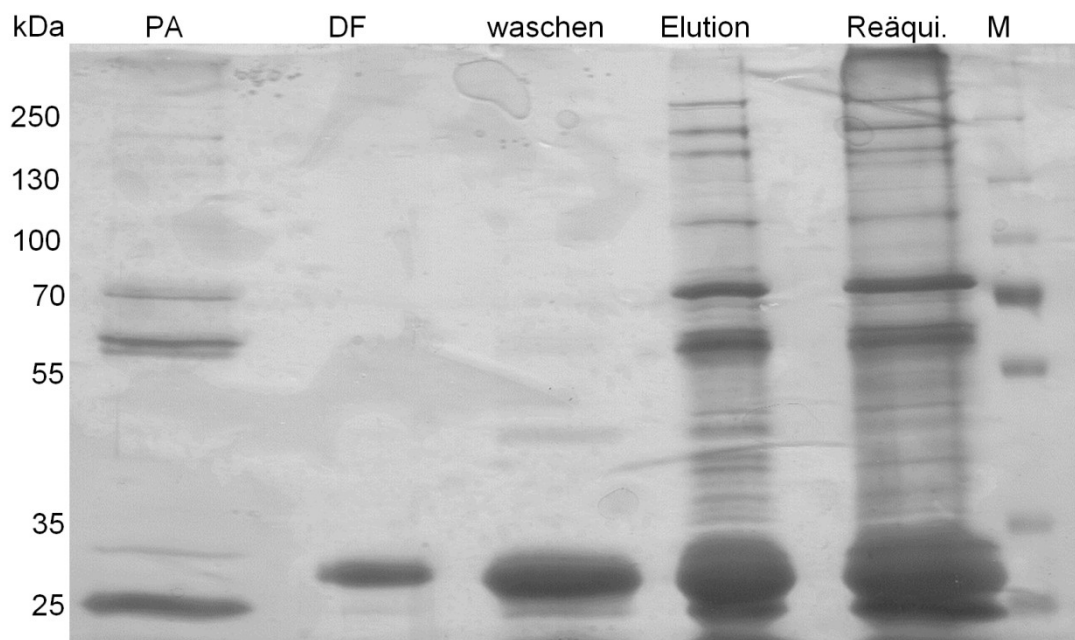
Abbildung 35 zeigt die Glorinaseaktivität der mit Con A hergestellten Fraktionen von Überstand von *P. pallidum*. Der unfraktionierte Überstand konnte 300  $\mu$ M Glorin komplett abbauen. Die nicht gebundene Fraktion konnte 2 %, die Waschfraktion 7,8 %, die gebundene Fraktion 68,9 % und die Fraktion des Reäquilibrierens 25,9 % von 300  $\mu$ M Glorin in 30 min umsetzen. Somit bindet die meiste Glorinase an der Con A-Sepharose und kann mit Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid eluiert werden.

Abbildung 36 veranschaulicht das silbergefärbte SDS-Gel der oben erwähnten vermessenen Fraktionen. PA ist der unfraktionierte Überstand und zeigt das Sekretom von *P. pallidum*. In der nicht gebundenen Fraktion konnte nur eine Bande zwischen 25-35 kDa detektiert werden, die aber nicht im Sekretom zu sehen war. Con-A-Monomer

besteht aus 237 AS mit einem Molekulargewicht von ca. 26 kDa (UniProt P02866). Somit könnte diese Verunreinigung, die in allen Fraktionen vorhanden war, durch von der Säule abgelöstes Con A entstanden sein. In der Waschfraktion konnten bis auf die Kontamination nur zwei schwache Banden bei ca. 40 und 25 kDa detektiert werden. In der gebundenen Fraktion ließ sich das komplette Sekretom ermitteln. Es konnte ein Konzentrationseffekt beobachtet werden, da Banden identifiziert wurden, die in der unfractionierten Probe (PA) nur schwach oder nicht zu sehen waren, aber im Sekretom (siehe 3.7.) vorhanden sind. In der Fraktion des Reäquilibrings konnte, im Vergleich zur gebundenen Fraktion, eine weitere Konzentration des Sekretoms beobachtet werden. Also werden alle Proteine aus dem Sekretom von *P. pallidum* gebunden und sind somit glykosyliert. Die Fraktionierung verlief aber nicht optimal, da die Fraktionen durch Con A verunreinigt wurden und im Reäquilibrungsschritt noch Proteine eluiert wurden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Anwendung eines Stufengradienten diese Probleme beseitigen würde.



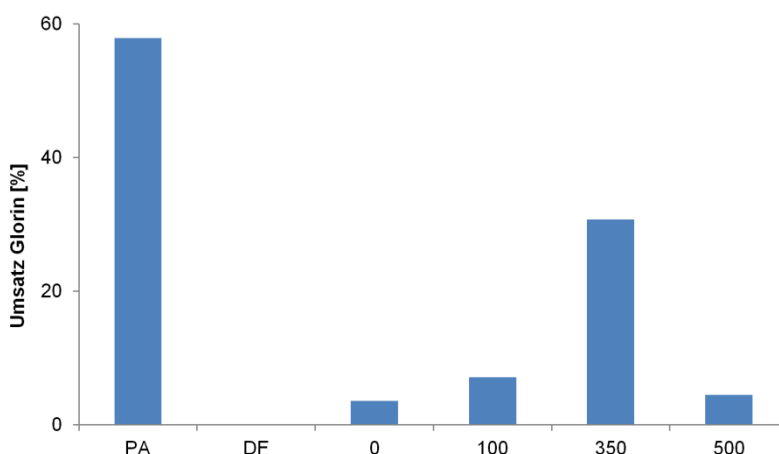
**Abbildung 35:** Glorinaseaktivität von mit Con A fraktioniertem Überstand von *P. pallidum*. PA: Probenaufrag, DF: ungebundene Fraktion, Elution erfolgte mit 500 mM Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid in Bindepuffer, Reäqui.: Reäquilibrieren mit Bindepuffer.



**Abbildung 36:** Silbergefärbtes SDS-Gel von mit Con A fraktioniertem Überstand von *P. pallidum*. Es wurden 75 µL von jeder Fraktion aufgetragen. M: Marker, PA: Probenaufrag, DF: ungebundene Fraktion, Elution erfolgte mit 500 mM Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid in Bindepuffer, Reäqui.: Reäquilibrieren mit Bindepuffer



Um die Reinigung zu optimieren und eventuell die glykosylierten Proteine zu fraktionieren, wurde ein 3-stufiger Gradient von 100, 350 und 500 mM Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid im Elutionspuffer angewendet. In der ungebundenen Fraktion erfolgte keine Glorinaseaktivität. Beim Waschschrift wurden 3,6 %, bei 100 mM Zucker 7,1 %, bei 350 mM Zucker mit 30,7 % und bei 500 mM Zucker 4,5 % von 300  $\mu$ M Glorin umgesetzt werden (Abbildung 37). Somit war die meiste Glorinaseaktivität in der Fraktion mit 350 mM Zucker. Aber ein Problem konnte hier ebenfalls beobachtet werden: Auch ohne Bestimmung der spezifischen Aktivität des Glorinumsatzes, bestand eine Diskrepanz zwischen der Aktivität in der nicht fraktionierten Probe (PA) und der Peakfraktion. Da die eluierten Proteine durch die Fraktionierung konzentriert wurden, läge es nahe, dass in der Peakfraktion eine stärkere Aktivität als in der PA-Fraktion vorhanden ist. Dies war aber nicht der Fall: Die PA-Fraktion setzte 57,9 % und die Peakfraktion (350 mM Zucker) 30,7 % des zugesetzten Glorins um.



**Abbildung 37:** Glorinaseaktivität von mit Con A fraktioniertem Überstand von *P. pallidum*. PA: Probenauftrag, DF: ungebundene Fraktion, 0-500 Konzentration von Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid im Elutionspuffer.

Die SDS-PAGE der oben genannten Fraktionen zeigte, dass alle Proteine vom Sekretom in der Peakfraktion enthalten waren. Die Kontamination von Con A-Monomer war auch zu sehen. Die Bande bei ca. 25 kDa konnte ab der Waschfraktion im SDS-Gel detektiert werden. Sie zeigte aber keine intensitätsabhängige Glorinaseaktivität, da die Bandenstärke in der 500 mM-Fraktion der der Peakfraktion entsprach, aber die Glorinaseaktivität 4,5 % zu 30,7 % war. Somit lassen sich mit der Con A-Fraktionierung die Banden, die einen Glorinasekandidaten enthalten könnten, nicht weiter eingrenzen. Da die Glorinase von der ConA-Säule gebunden werden konnte, muss die Glorinase ein

Glykoprotein sein. Des Weiteren zeigte die Fraktionierung, dass im Überstand von *P. pallidum* nur glykosylierte Proteine enthalten waren und er somit nicht mit cytosolischen Proteinen kontaminiert war.

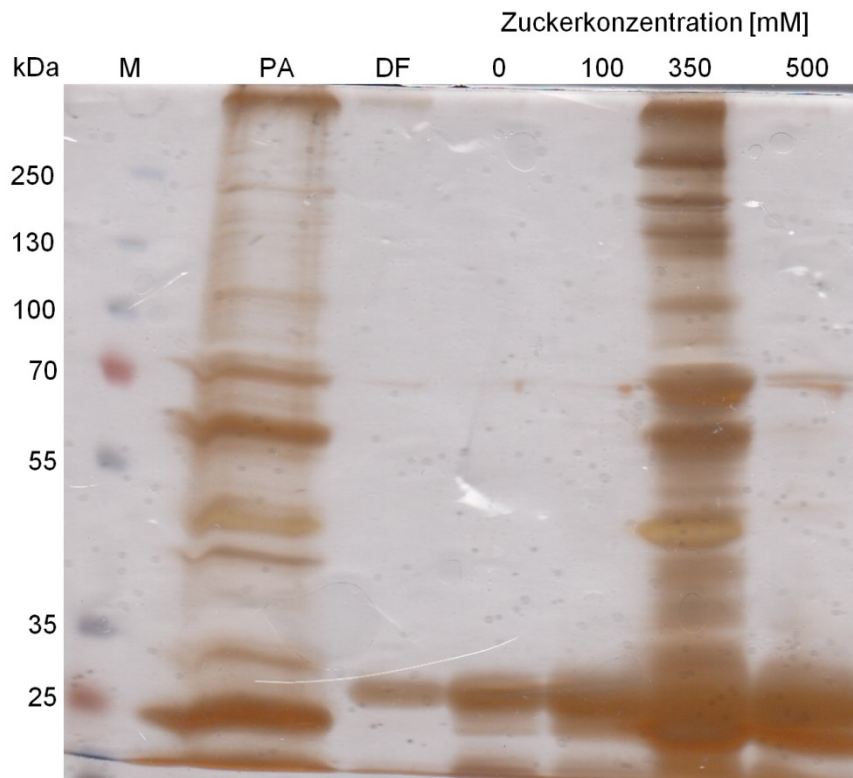
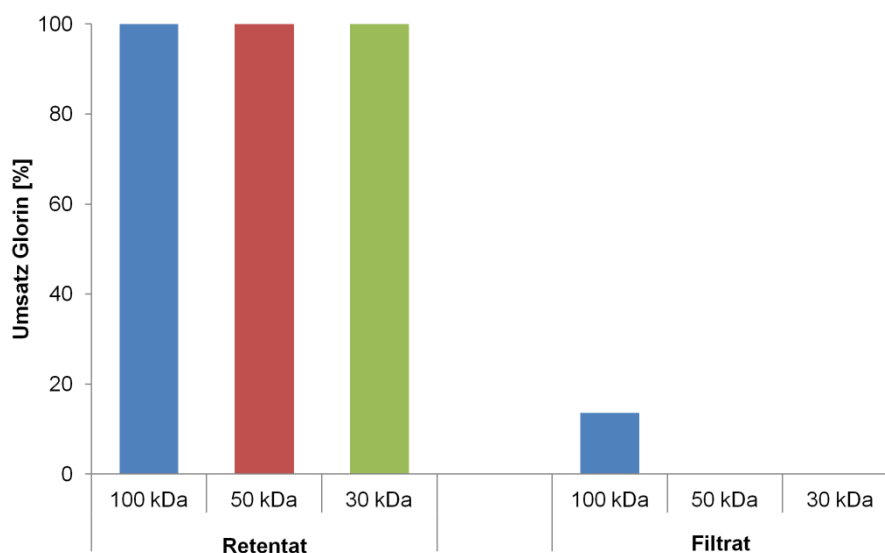


Abbildung 38: Silbergefärbtes SDS-Gel von mit Con A fraktioniertem Überstand von *P. pallidum*. Es wurden 75 µl von jeder Fraktion aufgetragen. M: Marker, PA: Probenauftrag, DF: ungebundene Fraktion, 0-500 mM Konzentration von Methyl-α-D-mannopyranosid im Elutionspuffer.

### 3.8.2 Ultrafiltration mit VivaSpin Turbo

Um das Molekulargewicht der Glorinase grob abzuschätzen, wurde Überstand von *P. pallidum* mittels Ultrafiltration fraktioniert. Dafür wurde eine VivaSpin® Turbo 15 mit Poren für Molekulargewichte von Proteinen (MWCO) kleiner als 30, 50 und 100 kDa verwendet. Die 10 kDa-Membran wurde ausgeschlossen, da routinemäßig der Überstand mit dieser Membran aufkonzentriert und die Glorinase von dieser Membran zurückgehalten wurde. Es wurden 5 mL Überstand pro VivaSpin® Turbo verwendet. Der Überstand wurde bei 3500 g bis auf 100 µL aufkonzentriert. Danach wurde das Retentat mit 17 mM Phosphatpuffer auf 5 mL wieder aufgefüllt, um so dann den Glorinase-Assay mit Retentat und Filtrat durchzuführen.

Abbildung 39 zeigt den Umsatz von Glorin durch Retentat und Filtrat. Bei allen MWCO wurde im Retentat Glorin vollständig abgebaut. Im Filtrat wurde nur bei einem MWCO von 100 kDa Glorin zu 13,6 % abgebaut. Das bedeutet, dass die aktive Glorinase ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa haben sollte.



**Abbildung 39: Glorinumsatz im Glorinase-Assay von Retentat und Filtrat nach Zentrifugation von Überstand von *P. pallidum*. Die angegebenen Molekulargrößen 30-100 kDa entsprechen dem MWCO der Ultrafiltrationsmembran**

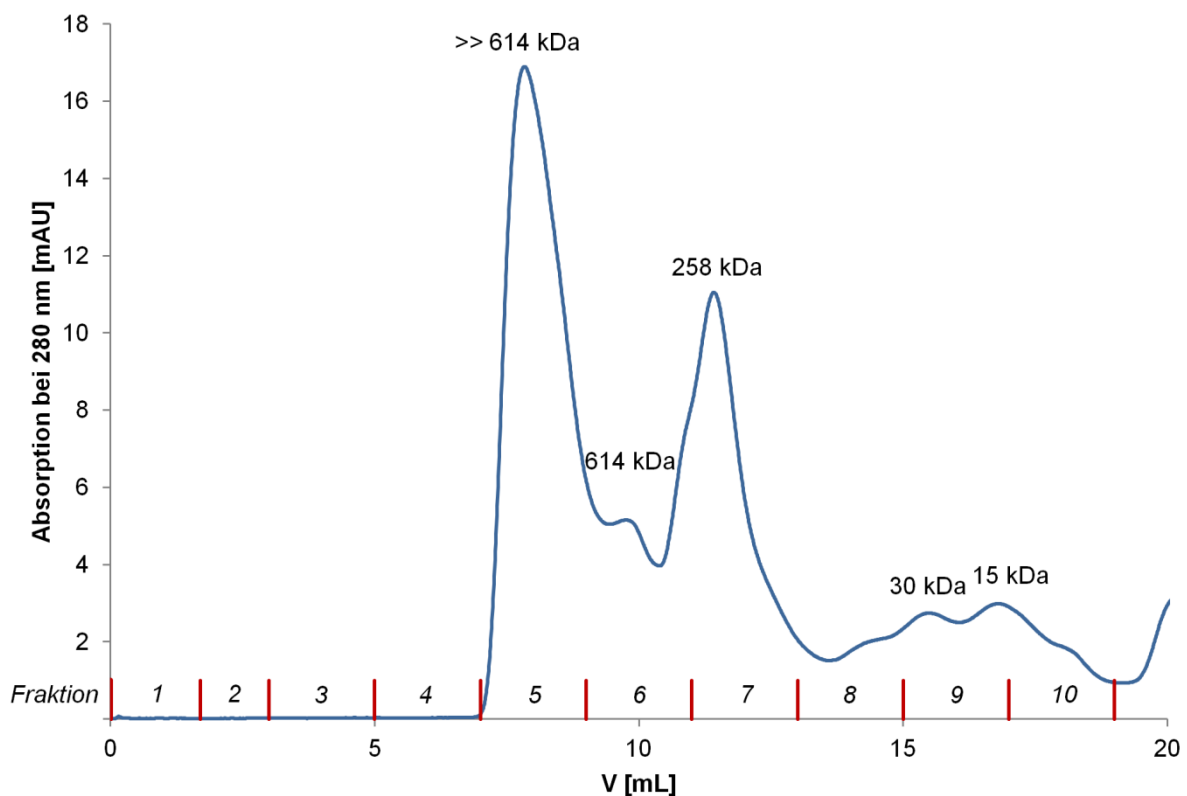
### 3.8.3 Größenausschlusschromatographie

Durch die Fraktionierung von sekretierten Proteinen von *P. pallidum* mittels Größenausschlusschromatographie sollte das native Molekulargewicht der Glorinase bestimmt werden.

Dafür wurden 54 mL Überstand auf 1,5 mL aufkonzentriert, um davon 500 µL auf einer Superdex 200 Increase 10/300 GL-Säule zu injizieren und mit einer Flussrate von 0,5 mL/min zu eluieren. Es wurden während der Elution 2 mL Fraktionen gesammelt. Mit allen Fraktionen erfolgte ein Glorinase-Assay.

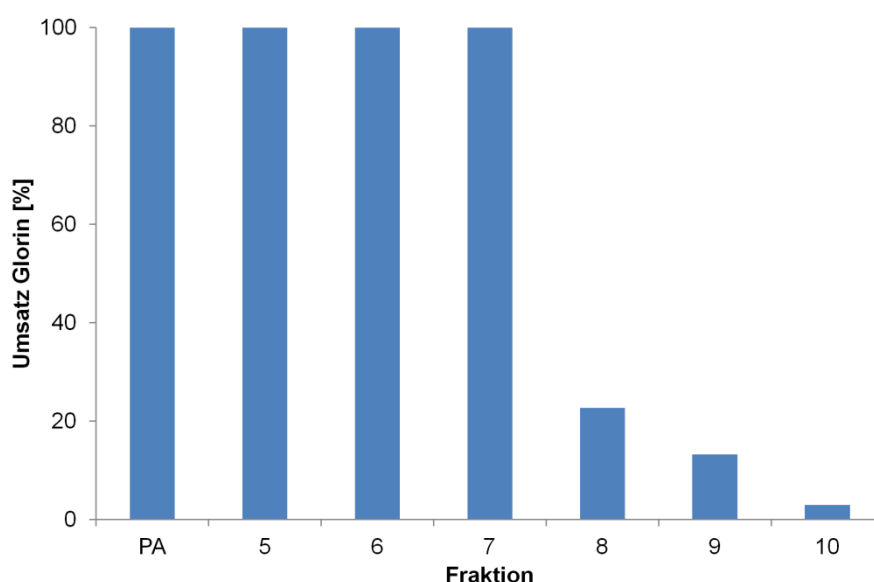
Das Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von konzentriertem Überstand zeigte 5 Proteinpeaks. Die Massen dieser Peaks wurden mit einer Kalibriergeraden (ermittelt mit Proteinstandards) berechnet. Der erste Peak eluierte bei 7,83 mL. Dies lag unterhalb des Ausschlussvolumens der Säule (8,3 mL) und somit konnte die Masse dieses Peaks nicht berechnet werden, aber sie war deutlich größer als

614 kDa. Der zweite Peak eluierte bei 9,75 mL, was einer Masse von 614 kDa entsprach. Der dritte Peak eluierte bei 11,42 mL und das ergab 258 kDa. Der vierte Peak eluierte bei 15,51 mL und das entsprach 30 kDa. Der fünfte Peak eluierte bei 16,82 mL, was 15 kDa ausmachte (Abbildung 40). Die Auflösung der Säule reichte aber nicht aus, um die Peaks bis zur Basislinie zu trennen. Peak 2 (614 kDa) wurde von Peak 1 und 3 fast verdeckt und auch Peak 3 zeigte eine Schulter. Peak 4 und 5 wurden von anderen Peaks überlagert. Des Weiteren fiel auf, dass die Absorption der Elution sehr schwach war, was auf eine geringe Proteinmenge hindeutete. Der Glorinase-Assay und die SDS-PAGE der Fraktionen würden zeigen, ob die Fraktionierung bezüglich der Glorinase erfolgreich war.



**Abbildung 40:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von Überstand von *P. pallidum*. 56 mL Überstand wurden mit einer Vivaspin® Turbo 15 (MWCO 10 kDa) auf 1,5 mL konzentriert und davon wurden 500 µL auf eine Superdex 200 Increase 10/300 GL injiziert und mit 0,5 mL/min eluiert. Es wurden alle 2 mL eine neue Fraktion aufgefangen. Die Massen wurden mit einer Kalibriergeraden berechnet.

Der Glorinase-Assay zeigte, dass die Glorinaseaktivität ab Fraktion 5 bis Fraktion 10 eluierte. Fraktion 5-7 setzten 100 % von 300  $\mu$ M Glorin innerhalb von 60 min bei RT um. Fraktion 8 konnte nur noch 22,7 %, Fraktion 9 13,2 % und Fraktion 10 2,9 % des zugesetzten Glorins in 60 min bei RT umsetzen (Abbildung 41). Mit der Größenausschlusschromatographie konnte die Glorinase demnach nicht fraktioniert werden, da sie eine Streuung über einen großen Größenbereich von über 614 bis ca. 200 kDa aufwies. Das Ergebnis aus der Ultrafiltration verdeutlicht, dass die native Glorinase größer als 100 kDa sein muss. Dabei könnte die native Glorinase auch aus unterschiedlich großen Multimeren zusammengesetzt sein. Dies könnte die Streuung der Glorinaseaktivität über einen größeren Massenbereich erklären.

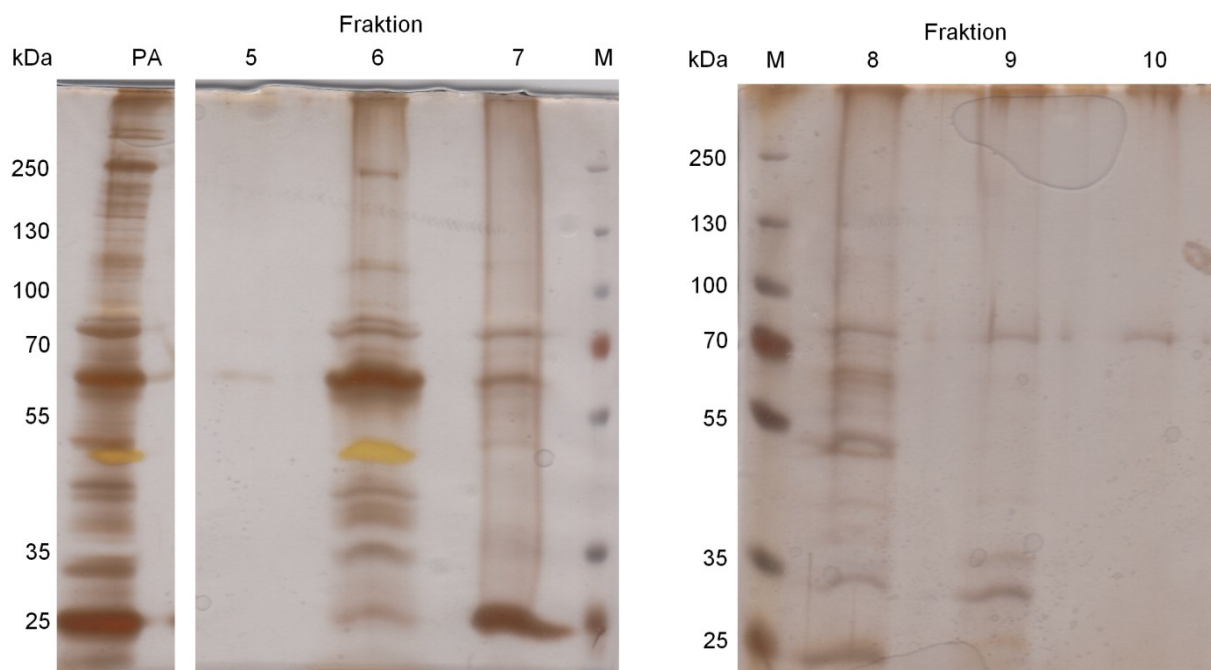


**Abbildung 41:** Glorinumsatz der durch Größenausschlusschromatographie gesammelten Fraktionen von Überstand von *Polysphondylium pallidum*. PA nicht fraktionierter Überstand.

Abbildung 42 zeigt die silbergefärbten SDS-Gele der Fraktionen 5-10. In Fraktion 5 konnte nur eine Bande bei ca. 60 kDa detektiert werden. Fraktion 6 besaß mehrere Banden von 250-25 kDa. In Fraktion 7 ließen sich 4 Banden bei ca. 80, 60, 50 und 25 kDa identifizieren. Fraktion 8 wies Banden bei 80, 60, 50, 30 und 25 kDa auf. In Fraktion 9 befanden sich 3 Banden bei ca. 80, 35 und 30 kDa. In Fraktion 10 konnte eine Bande bei 80 kDa festgestellt werden.

Es ließen sich aber nicht alle Banden aus der nicht fraktionierten Fraktion in den eluierten Fraktionen wiederfinden. Das lag wahrscheinlich an dem starken Verdünnungseffekt durch die Größenausschlusschromatographie.

Auch das SDS-Gel legt nahe, dass die native Glorinase als Oligomer vorliegt, da Fraktion 5 ( $M_w > 614$  kDa) laut SDS-Gel nur ein Protein mit ca. 60 kDa enthielt. Die native Glorinase könnte aber auch ein Multiproteinkomplex sein. In diesem Fall wären einige Proteinkandidaten hier nicht detektiert gewesen. Es könnte aber auch sein, dass andere Biopolymere wie z.B. RNA in Fraktion 5 eluierten. Dies würde die höchste Absorption in der Gelfiltration bei geringstem Proteingehalt (laut SDS-Gel) erklären. Eine weitere Begründung wäre eine artifizielle Aggregation der Proteine durch die vorherige Konzentration. Eine Aussage über die Aktivitäts-Bandenstärke-Korrelation zu treffen, ist schwierig, da die Glorinaseaktivität über alle Größen eluierte und die Fraktionen 5-7 Glorin vollständig umgesetzt hatten. Auszuschließen ist aber trotzdem die Bande bei ca. 80 kDa, da sich diese nicht in Fraktion 5 befand, aber dafür in der Fraktion 8. Die Bande bei ca. 25 kDa konnte auch ausgeschlossen werden, da auch sie in Fraktion 5 nicht und in Fraktion 8 vorhanden war. Des Weiteren war die Intensität dieser Bande in Fraktion 8 stärker als in Fraktion 6. Dennoch lieferte Fraktion 5, die Glorin vollständig umsetzte, während im SDS-Gel nur eine Bande bei 60 kDa detektiert werden konnte, eine wichtige Information. Die Intensität dieser Bande bei ca. 60 kDa nahm in Fraktion 6 stark zu, wurde ab Fraktion 7 wieder schwächer und ab Fraktion 9 konnte sie nicht mehr detektiert werden. Das könnte zum Verlauf der Glorinaseaktivität (Abbildung 41) passen.



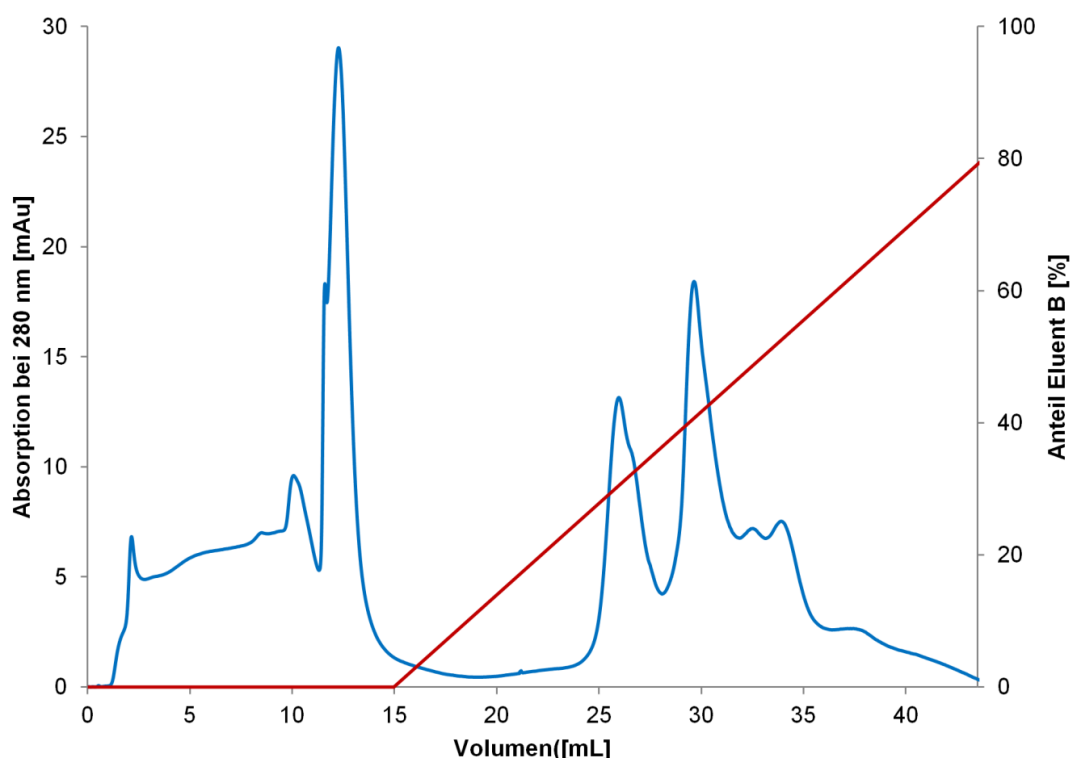
**Abbildung 42:** Silbergefärbtes SDS-Gel der Fraktionen 5-10 von der Größenausschlusschromatographie von Überstand von *P. pallidum*. M: Marker, PA: nicht fraktionierter Überstand

### 3.8.4 Anionenaustauschchromatographie

Eine weitere sinnvolle Methode, um Proteine zu fraktionieren oder zu reinigen, ist die Anionenaustauschchromatographie (AAC). Dabei binden die Proteine aufgrund ihrer negativen Oberflächenladung an z.B. an quaternäre Ammoniumverbindungen. Die Proteine können dann mittels pH-Änderung oder ansteigenden Salzgehalts im Elutionspuffer eluiert werden.

Die erste Fraktionierung durch AAC erfolgte mit einer HiTrap CaptoQ CV 1 mL an einem Äkta-pure-25-System (GE Healthcare). Der Überstand von *P. pallidum* wurde mittels einer Vivaspin® Turbo 15 mit einer MWCO von 10 kDa auf den Laufpuffer umgepuffert und dann auf die Säule gegeben.

Das Chromatogramm der Fraktionierung mittels AAC zeigt eine deutliche Auftrennung der in der Probe enthaltenen Proteine. So gab es Moleküle, die nicht gebunden wurden und während des Probenauftrags und im Waschschrift (0-15 mL) eluierten. Die Proteine im Peak 1 eluierten bei 12,3 mL. Es traten aber auch Proteine auf, die unterschiedlich stark banden und so bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluierten. Die Proteine im Peak 2 eluierten bei 26,0 mL und im Peak 3 bei 29,7 mL (Abbildung 43). Somit schien die Fraktionierung mittels AAC eine geeignete Methode zu sein, um die Glorinase in wenigen Fraktionen zu konzentrieren, andere Proteine abzutrennen und so die Glorinase zu detektieren.

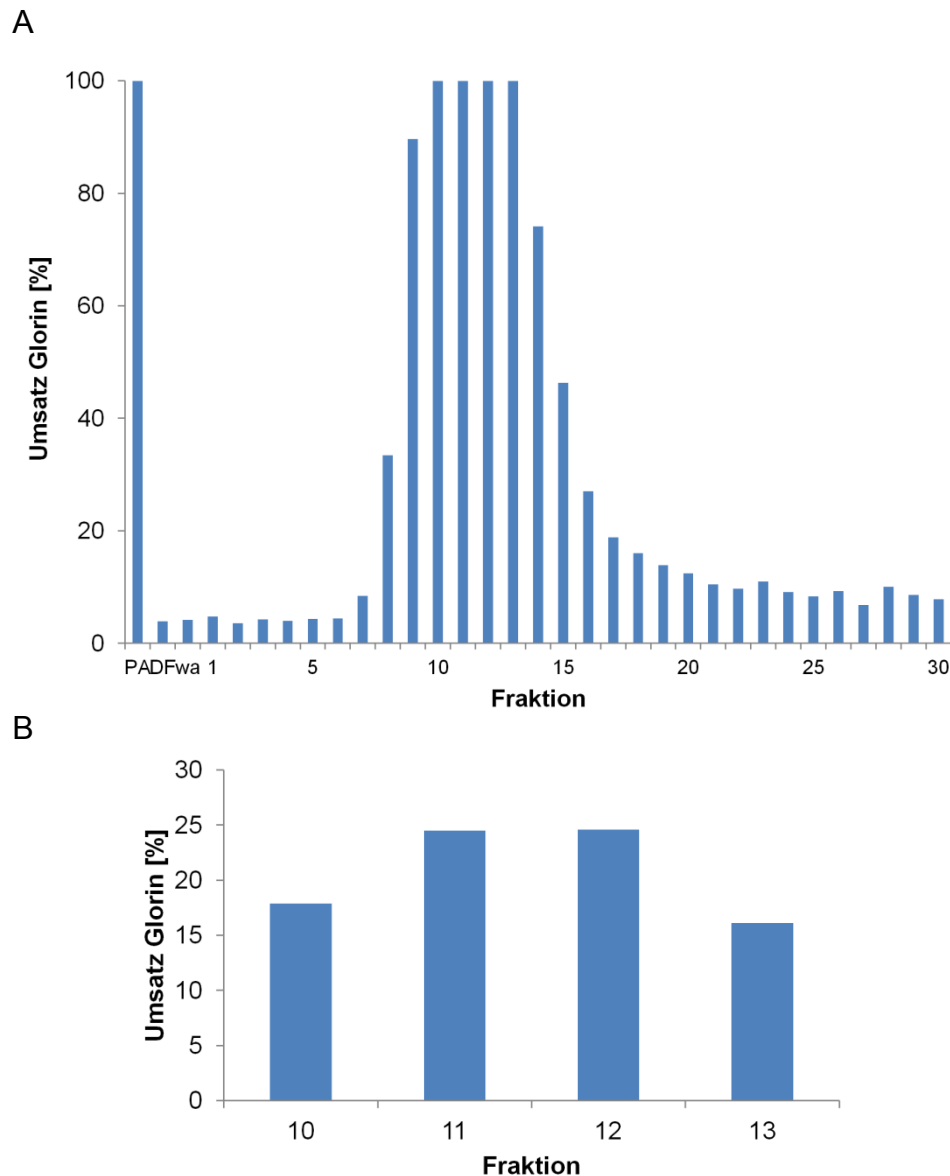


**Abbildung 43:** Chromatogramm (blaue Linie) der Fraktionierung von Überstand von *Polysphondylium pallidum* mittels Anionenaustauschchromatographie. Die Elution erfolgte mit 1 M NaCl im Eluent B (20 mM Tris/HCl pH 7,5). Rote Linie Anteil: von Eluent B im Laufpuffer

Es wurden mehrere Ansätze von 3-200 mL Überstand fraktioniert. Während des Gradienten wurde alle 1 mL eine neue Fraktion aufgefangen. Mit allen Fraktionen erfolgte ein Glorinase-Assay und anschließend wurden Fraktionen mit hoher Glorinaseaktivität per SDS-PAGE analysiert.

Die Fraktionierung von 3,5 mL Überstand zeigte einen Glorinaseaktivitätspeak von Fraktion 8-16, wobei die Fraktionen 10-12 100 % des zugesetzten Glorins umsetzten. Die Fraktionen, die vor dem Peak eluierten (bis Fraktion 6), setzten ca. 5 % und Fraktionen die nach dem Peak eluierten (ab Fraktion 25), setzten 6 – 10 % des zugesetzten Glorins um (Abbildung 44 A). Dies ist eine Hintergrundaktivität, da es bei einem pH-Wert von 8 zur schwachen Autohydrolyse des Glorins kommt (siehe Abschnitt 3.1.3.). Um die Fraktion mit der meisten Glorinaseaktivität genau zu bestimmen, wurde der Glorinase-Assay mit den Fraktionen 10-12 wiederholt. Jetzt wurden die Fraktionen aber vor dem Assay mit 17 mM Phosphatpuffer zehnfach verdünnt (9  $\mu$ L Fraktion + 81  $\mu$ L Puffer). Die Fraktion 10 setzte nun 17,9 %, Fraktion 11 24,5 %, Fraktion 12 24,6 % und Fraktion 13 16,1 % des zugesetzten Glorins um (Abbildung 44 B). Somit besaßen die Fraktionen 11 und 12 die stärkste Glorinaseaktivität.

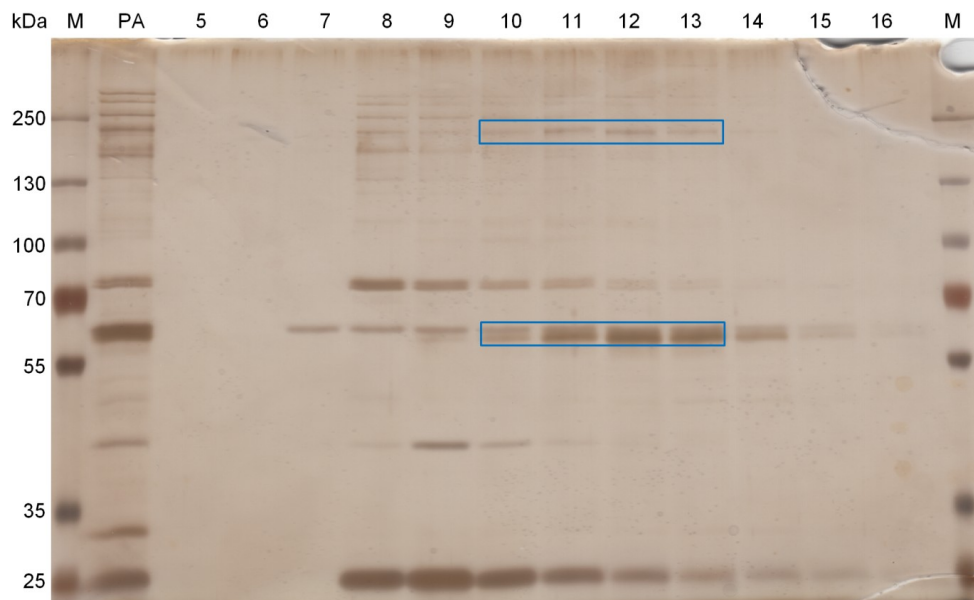




**Abbildung 44:** Glinumsatz der mittels Anionenaustauschchromatographie gesammelten Fraktionen von 3,5 mL Überstand von *P. pallidum*. A: Fraktionen pur (90 µL Fraktion + 10 µL Glininstammlösung) im Glinase-Assay eingesetzt. PA: nicht fraktionierter Überstand, DF: nicht gebundene Fraktion, wa: Waschfraktion, 1-30 Fraktionen während des Salzgradienten. B: Fraktionen vor Glinase-Assay 10-fach verdünnt (9 µL Fraktion + 81 µL 17 mM Phosphatpuffer + 10 µL Glininstammlösung)

Das SDS-Gel der zuvor beschriebenen Fraktionierung zeigte, dass alle sichtbaren Banden, bis auf eine Bande bei ca. 30 kDa, vom Sekretom (PA) von *P. pallidum* in den Fraktionen 7-16 detektiert wurden. Das SDS-Gel zeigte eine gute Fraktionierung der Banden. So waren die Banden bei 25 und 40 kDa in der Fraktion 9 am stärksten. Die Bande bei ca. 80 kDa war in Fraktion 8 am stärksten und nahm dann bis Fraktion 13 ab (Abbildung 45). Im Vergleich mit der Verteilung der Glinaseaktivität (Abbildung 44) hatten nur zwei Banden denselben Intensitätsverlauf. Die 1. Bande lag unterhalb von 250 kDa war in Fraktion 11 und 12 am stärksten und nahm in Fraktion 10 und 13 wieder ab. Die 2. Bande lag bei ca. 60 kDa und war die untere einer Doppelbande. Sie

konnte zuerst in Fraktion 9 detektiert werden, nahm bis Fraktion 12 zu und danach wieder ab. Des Weiteren wurde diese Bande bei ca. 60 kDa schon in der Größenausschlusschromatographie als mögliche Bande, die einen Glorinasekandidaten enthalten könnte, ermittelt.



**Abbildung 45:** Silbergefärbtes SDS-Gel der Fraktionierung von 3,5 mL Überstand von *P. pallidum* mittels Anionenaustauschchromatographie. 75  $\mu$ L wurden von jeder Fraktion aufgetragen. M: Marker, PA: nicht fraktionierter Überstand. Blaue Rechtecke: Banden, deren Intensitätsverlauf mit dem Verlauf der Glorinaseaktivität aus Abbildung 44 korreliert.

Die Fraktionierung mittels AAC wurde mit 200 mL Überstand (ca. 66x von vorheriger Fraktionierung) von *P. pallidum* wiederholt. Für den Glorinase-Assay wurden die Fraktionen vor der Zugabe von Glorin zehnfach mit 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 verdünnt (9  $\mu$ L Fraktion + 81  $\mu$ L Puffer). Das hatte zwei Vorteile: Die Peakfraktion hatte einem Glorinumsatz deutlich unter 100 % und die Hintergrundaktivität konnte durch den geringeren pH-Wert stark reduziert werden. Hier konnten ein Aktivitätspeak von Fraktion 12 – 23 und die Peakfraktion 16 ermittelt werden (Abbildung 46).

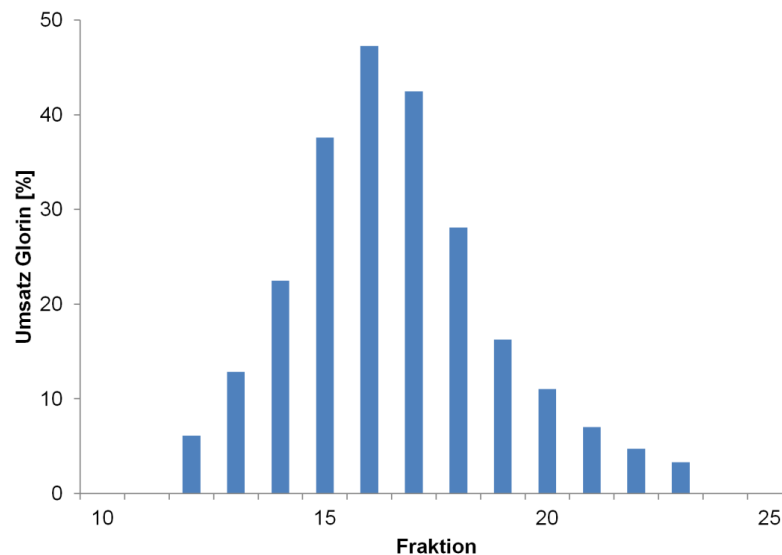


Abbildung 46: Glorinumsatz der mittels Anionenaustauschchromatographie gesammelten Fraktionen von 200 mL Überstand von *P. pallidum*. Die Fraktionen wurden vor dem Glorinase-Assay zehnfach mit 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 verdünnt (9 µL Fraktion + 81 µL Puffer).

Im SDS-Gel der 200 mL Fraktionierung mittels AAC konnten mehr Banden detektiert werden als im vorherigen SDS-Gel (Abbildung 45). Es wurden auch zwei zusätzliche Banden bei ca. 40 kDa detektiert, deren Intensitätsverlauf mit dem Verlauf der Glorinaseaktivität korreliert. Die Bande bei 250 kDa konnte in diesem SDS-Gel nicht reproduziert werden (Abbildung 47). Dieses Ergebnis zeigte, dass eine gewisse Menge an Überstand nötig war, um möglichst das gesamte Sekretom sichtbar zu machen.

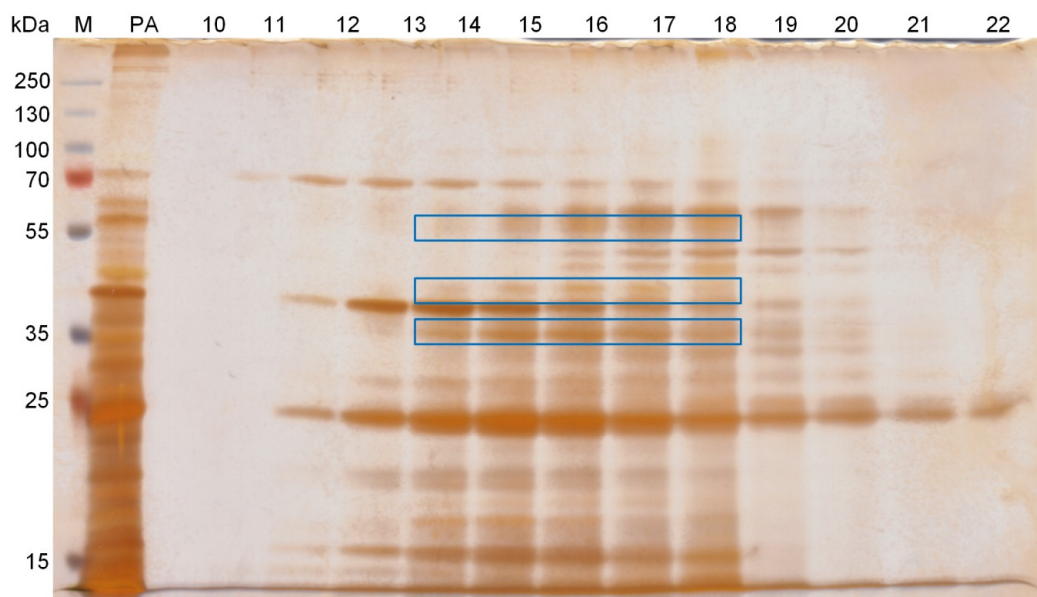


Abbildung 47: Silbergefärbtes SDS-Gel der Fraktionierung von 200 mL Überstand von *P. pallidum* mittels Anionenaustauschchromatographie. PA entspricht 45 µg Gesamtprotein. Ansonsten wurden 200 µL von jeder Fraktion lyophilisiert in, 100 µL 1xSDS-Probenpuffer resuspendiert und auf das Gel aufgetragen. M: Marker, PA: nicht fraktionierter Überstand. Blaue Rechtecke: Banden, deren Intensitätsverlauf mit dem Verlauf der Glorinaseaktivität aus Abbildung 46 korreliert.

### 3.9 Proteomische Analyse der Fraktionierung des Überstandes

Aus den aktivitätsgeleiteten Fraktionierungen mittels Anionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie konnten mehrere Banden ermittelt werden, die eine Glorinase enthalten könnten. Die Proteine in den Banden oder Fraktionen sollten mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

Aus der Fraktionierung von 3 mL Überstand (Abbildung 45) wurden drei Banden zur genaueren Analyse ausgewählt. Die Banden wurden aus dem SDS-Gel bei Fraktion 12 ausgeschnitten. Die erste Bande wurde bei 250 kDa und die zweite und dritte Bande wurden aus der Doppelbande bei ca. 60 kDa ausgeschnitten. Die Messungen führten Herr Dr. Schlott und Frau Willitzer in der Arbeitsgruppe Große am Institut für Alternsforschung Jena durch. In den Banden 1 und 2 (250 kDa und obere Bande bei 60 kDa) konnten keine Proteine identifiziert werden. Bande 3 enthielt das Protein PPA\_G1385236 (PPL\_00852) (Tabelle 9). Eine Suche in der Conserved Domains Datenbank des NCBI [82] ergab, dass das Protein PPA\_G1385236 eine Carboxylesterhydrolase sein könnte. Dieses Ergebnis passte zu der Annahme, dass Glorin durch die Glorinase durch Abspaltung des Ethanol von der  $\gamma$ -Carboxylgruppe des Glutamatrestes von Glorin inaktiviert wird. Das machte PPA\_G1385236 zu einem validen Glorinasekandidaten.

**Tabelle 9: Identifizierte Proteine, deren Molekulargewicht und vermutete Proteinfunktion**

Bande	Eintragsnummer*	MW** [kDa]	Vermutete Proteinfunktion***
1	/	/	/
2	/	/	/
3	PPL_00852	59,5	Carboxylesterase

\*aus Proteom von SACGB-Datenbank, <http://sacgb.leibniz-flf.de/cgi/index.pl?ssi=free>

\*\* theoretisches Molekulargewicht anhand der Primärsequenz

\*\*\* ermittelt mit Blast-Tool und der Conserved Domains Datenbank des NCBI [81, 82]

Aus der Fraktionierung von 200 mL Überstand wurde eine andere Vorgehensweise zur Identifizierung der Proteine gewählt. Die Analyse führte Daniel Abegg in der Arbeitsgruppe Adibekian an der Universität Genf (jetzt Scripps-Institut Florida) durch. Hier wurden die gesamten Fraktionen 14, 15 und nicht-fraktionierter Überstand

analysiert. Die Fraktion 16, die Fraktion mit der höchsten Glorinaseaktivität, ging während der Analyse verloren. Für die LC-MS-Analyse wurde diesmal kein SDS-Gel zum Ausschneiden der Banden angefertigt, sondern die gesamte Fraktion wurde jeweils tryptisch verdaut und 1 µg Gesamtprotein per LC-MS/MS analysiert. Anhand dieser Ergebnisse konnte zusätzlich ein Anreicherungsfaktor (Häufigkeit in Fraktion/Häufigkeit in nicht-fraktioniertem Überstand) der identifizierten Proteine bestimmt werden.

Da in diesem Versuchsansatz nicht einzelne Banden, sondern gesamte Fraktionen untersucht wurden, ergab sich deutlich mehr als ein Proteinkandidat. So wurden in dem nicht-fraktionierten Überstand 1553 Proteine identifiziert. 786 Proteine konnten ermittelt werden, die in den Fraktion 14 und 15 vorhanden waren. Bei Anwendung eines Anreicherungsfaktors über 2 reduzierte sich die Zahl der gefundenen Proteine auf 185. 89 vermutliche Esterasen wiesen die Fraktion 14 und 15 auf. In diesen 89 vermutlichen Esterasen befanden sich aber nur zwei vermutliche Carboxylesterasen, die interessante Enzymklasse bezüglich der Glorinase (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Auswertung der proteomischen Analyse von Fraktion 14 und 15 aus der Fraktionierung von 200 mL Überstand von *P. pallidum* (Abbildung 46). Angegeben ist die Anzahl gefundener Proteine in den Fraktionen. Anreicherungsfaktor = Intensität Protein X in Fraktion 14 oder 15/Intensität Protein X in nicht-fraktioniertem Überstand**

Probe	Anzahl gefundener Proteine
Nicht fraktionierter Überstand	1553
Proteine in Fraktion 14 und 15 enthalten	786
Proteine mit Anreicherungsfaktor über 2 in Fraktion 14 und 15	185
Vermutete Esterasen	89
Vermutete Carboxylesterasen	2

Die vermutliche Carboxylesterase PPA\_G1385236 (PPL\_00852) wurde schon bei der vorherigen proteomischen Analyse aus SDS-Gel-Banden (siehe Tabelle 9) identifiziert und in diesem Experiment erneut beobachtet, was sie als Kandidaten für die Glorinase bekräftigte. Der Anreicherungsfaktor von 1000 wurde angenommen, da sich das Protein in dem nicht-fraktionierten Überstand nicht detektieren ließ. Zusätzlich wurde hier das Protein mit der Eintragsnummer PPA\_G1286130 (PPL\_01946) als mögliche Carboxylesterase und somit mögliche Glorinase identifiziert. Der Anreicherungsfaktor in

der Fraktion 14 war mit 212,9 deutlich höher als in Fraktion 15 mit 145,8 (Tabelle 11). Der Verlauf der Glorinaseaktivität der Fraktionen 14 und 15 korreliert nicht mit dem Anreicherungsfaktor aus der LC-MS/MS (siehe Abbildung 46).

**Tabelle 11:** Die zwei identifizierten Carboxylesterasen aus der proteomischen Analyse der gesamten Fraktionen 14 und 15 aus der Fraktionierung von 200 mL Überstand von *Polysphondylium pallidum*, deren Anreicherungsfaktor (Intensität von Protein X in Fraktion Y/Intensität von Protein X in nicht-fraktioniertem Überstand) und Molekulargewicht

Eintragsnummer*	Anreicherungsfaktor Fraktion 14	Anreicherungsfaktor Fraktion 15	MW** kDa
PPL_00852	1000	1000	59,5
PPL_01946	212,9	145,8	57,3

\*aus Proteom von SACGB-Datenbank, <http://sacgb.leibniz-fli.de/cgi/index.pl?ssi=free>

\*\* theoretisches Molekulargewicht anhand der Primärsequenz

### 3.10 Bioinformatische Charakterisierung der Glorinasekandidaten

Eine Blastp-Analyse von PPA\_G1385236 ergab, dass dieses Protein zu der Gruppe von  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen-Carboxylesterasen gehört. Homologe Proteine wurden als Cholinesterasen E.C. 3.1.1. identifiziert. Innerhalb von *P. pallidum* ließen sich zwei Paraloge finden: 1. PPA\_G1374042 mit 80 % und 2. PPA\_G1286130 mit 59 % Sequenzidentität. PPA\_G1286130 wurde schon in der vorherigen proteomische Analyse (s.o.) als weiterer möglicher Glorinasekandidat identifiziert. Innerhalb der sozialen Amöben konnte in jeder Gruppe ein Ortholog mit mindestens 55 % Sequenzidentität identifiziert werden. In dem Bakterium *Xenophilus azovorans* konnte eine Carboxylesterase mit 42 % und in der Außengruppe zu den sozialen Amöben *Acanthamoebae castellanii* eine mit 41 % Übereinstimmung identifiziert werden. Aber auch in Blauaugen-Reisfischen (*Oryzias melastigma*) wurde eine Cholinesterase mit 32 % Übereinstimmung identifiziert.

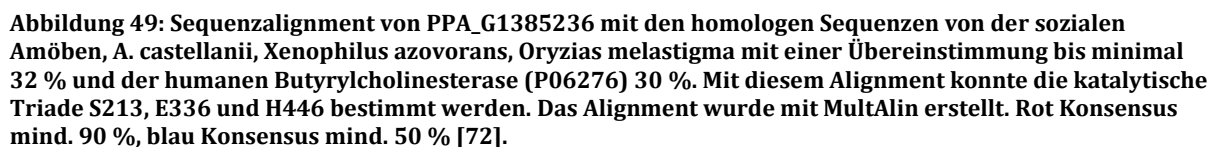
Die Software SignalP 4.1 ermittelte ein N-terminales Signalpeptid von 23 Aminosäuren Länge (Abbildung 48) [84].

MRISNNYLATTIILLSGLLLVAQSSSGNTYSLNVLSPRSGIYNGIYMNETRAFLGIPYAQPPIGNLRFKP  
 PQSIYQWGTINATTMPPSCWQSGKPTGYNYSEDCLYLVNVTYPKNMHYVNPVYNCLNPVMVFLHGGR  
 FWTGAATDFLGDHLAAAGNVVNVIIQYRLNIFGFQSFDDNTNLGLQDQQMALRWVQENIRAFGGDPDR  
 VTIYGESAGGSSALYHLTMPSYNLYNRVVAQSAWQWAIPTAATSRVMTAAYAATKGCANITTSGAPD  
 YAAILRLSSKSASDITPTVGNSDFFVPIVDGNMIKSQLLTSFKQGRYNKRANIIIGHNYE<sup>GHFMAFSRL</sup>  
 GFVTPLDPVSDTTLQNSLTRYLDVYFTPAQRDEVISWYLPVASELGNWLGGSEFFGDYII<sup>CGSILTAEY</sup>  
 LSQQGVQFNSYIFNYSSPNFPADWFLAASHGNELPYIFFQDVYTPYPFAPADAALAHMSRSWTDYA  
 DNGNPSGPF<sup>SRWPSYPDAMYYPDVMNYDDKRPYKKAICENWRQLFEAY</sup>

**Abbildung 48:** Primärsequenz des Glorinasekandidaten PPA\_G1385236. Grün: Signalsequenz M1-A23, blau: Cystein, rot: katalytische Triade S213, E336, H446. Die Signalsequenz wurde durch Analyse mit SignalP 4.1 identifiziert. Ein Sequenzalignment mit der humanen Butyrylcholinesterase (UniProt P06276) ermittelte die katalytische Triade (siehe Abbildung 49).

Durch ein Sequenzalignment von PPA\_G1385236 mit der strukturell gut untersuchten humanen Butyrylcholinesterase (hBCHE UniProt P06276 30 % Übereinstimmung) und den homologen Proteinen der sozialen Amöben, dem Bakterium *X. azovorans*, der Außengruppe zu den sozialen Amöben *A. castellanii* und dem Blauaugen-Reisfisch *O. melastigma* konnten konservierte Bereiche und dadurch einige strukturelle und chemische Eigenschaften identifiziert werden. So gab es vier hochkonservierte Bereiche mit mindestens vier aufeinanderfolgenden Aminosäuren und mehrere Bereiche mit 1-3 aufeinanderfolgenden hochkonservierten Aminosäuren. Es ließen sich die für Carboxylesterasen typische katalytische Triade als Serin213, Glutamat336 und Histidin446 (rot in Abbildung 48) ermitteln. Von den sieben Cysteinen waren fünf hochkonserviert. Durch die drei Cysteinbrücken in der hBCHE konnten zwei in PPA\_G1385236 eindeutig identifiziert werden: 1. C90-C105, 2. C407-C522. Die dritte Cysteinbrücke bildete sich wahrscheinlich zwischen dem hochkonservierten Cystein264 und dem nur in Amöben und Bakterien konservierten Cystein281. Die hochkonservierte GG-Einheit bei AS136-137 war vermutlich an der Substratbindung beteiligt. Es gab sechs hochkonservierte Proline (Abbildung 49).







### 3.11 Expression und Aktivität der Glorinasekandidaten

Um die Glorinasekandidaten zweifelsfrei als Glorinase zu identifizieren, sollte gezeigt werden, dass die glorinabbauende Aktivität auch durch rekombinant exprimierte Gene der Glorinasekandidaten dargestellt werden kann. Dafür wurde als Expressionswirt zunächst *Escherichia coli* und später *Dictyostelium discoideum* AX2 eingesetzt. Vor der Expression der Gene wurden die Sequenzen der Zielgene mittels Sequenzierung kontrolliert.

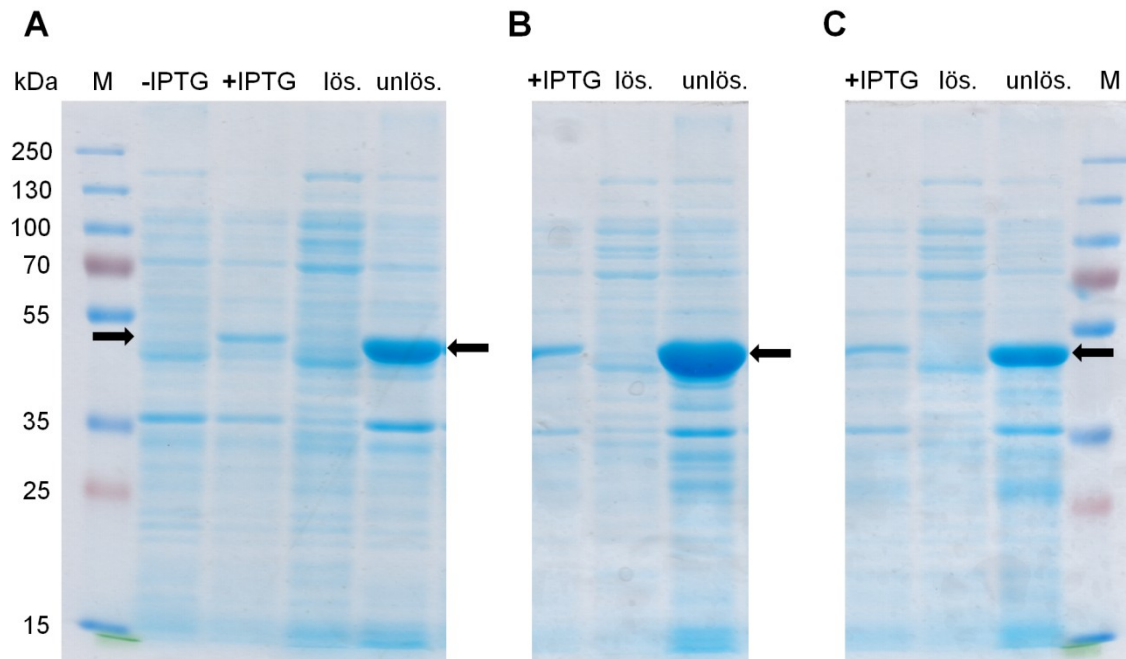
#### 3.11.1 Expression von *PPA\_G1385236* in *Escherichia coli*

Für die Expression von *PPA\_G1385236* in Expressionsstämmen von *E. coli* wurde die N-terminale Signalsequenz deletiert und für die spätere Reinigung ein N-terminaler His<sub>6</sub>-Tag eingeführt (Abbildung 50).



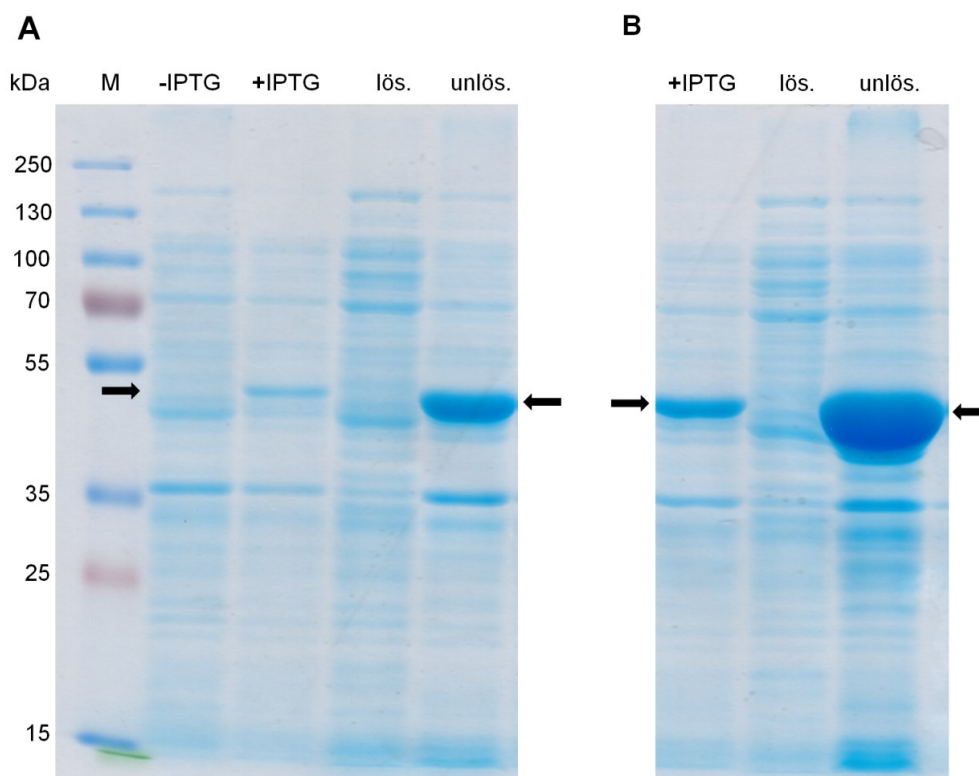
Abbildung 50: Schematische Darstellung des Konstruktes für den Glorinasekandidaten *PPA\_G1385236* zur Expression in *E. coli*. Ein His<sub>6</sub>-Tag wurde N-terminal an die AS 24 von *PPA\_G1385236* fusioniert.

Die ersten Expressionsversuche von rekombinantem *PPA\_G1385236* erfolgten bei Temperaturen von 22, 30 und 37 °C. Das theoretische Molekulargewicht von *PPA\_G1385236* betrug 58 kDa. Das SDS-Gel zeigte, dass ab der Zugabe von IPTG ein Protein gebildet wurde, das unterhalb von 55 kDa migrierte. Bei 30 °C wurde etwas mehr Protein gebildet als bei 22 und 37 °C (Abbildung 51 +IPTG). Bei keiner der drei Expressionstemperaturen konnte nach Zellaufschluss und Zentrifugation ein lösliches rekombinantes Protein detektiert werden (Abbildung 51).



**Abbildung 51:** Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von *PPA\_G1385236* in *E. coli* BL21 (DE3). Die transformierten Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression erfolgte bei A 22 °C, B 30 °C, C 37 °C und 140 rpm und wurde durch Zugabe von 0,1 mM IPTG gestartet. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert. Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Es bildete sich ein Protein unterhalb der Lauffhöhe von 55 kDa gebildet (schwarze Pfeile). Bei keinem Expressionsansatz konnte lösliches *PPA\_G1385236* detektiert werden.

Für die folgende Expressionsanalyse wurden 22 °C als Expressionstemperatur gewählt. Die Expressionsdauer wurde bei 4 und 22 h getestet. Bei 22 h Expressionsdauer bildete sich mehr Protein als bei 4 h und es ließ sich keine deutliche Degradierung der Proteinbande feststellen. Nach Zellaufschluss und Zentrifugation wurde auch hier nur unlösliches rekombinantes Protein detektiert (Abbildung 52).

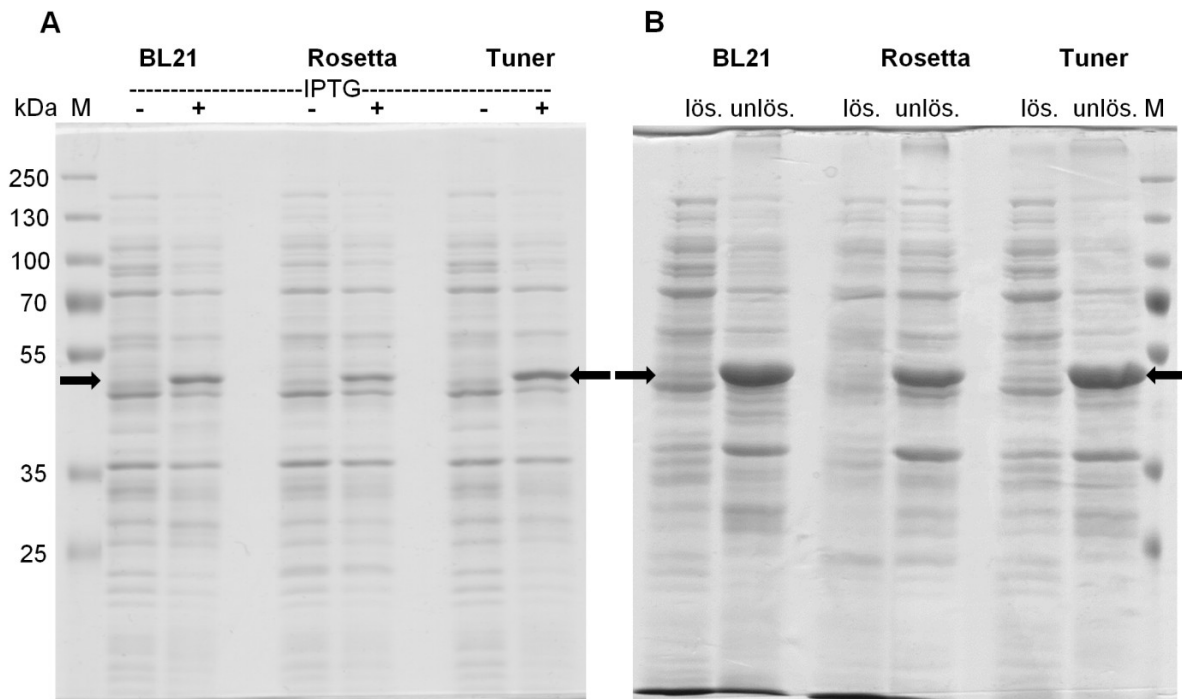


**Abbildung 52:** Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von *PPA\_G1385236* in *E. coli* BL21 (DE3). Die transformierten Zellen wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression fand bei 22 °C und 140 rpm statt und startete durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h (A) bzw. 22 h (B) Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert. Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Es bildete sich ein Protein, welches unterhalb der Laufhöhe von ca. 55 kDa lief (schwarze Pfeile). Bei keinem Expressionsansatz konnte lösliches *PPA\_G1385236* detektiert werden.

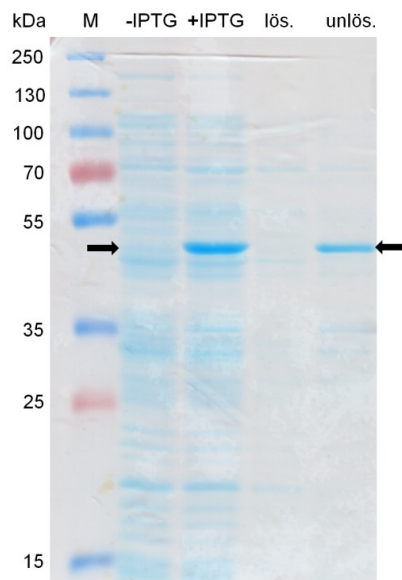
Da die Variation der Expressionstemperatur und -dauer kein lösliches Protein lieferte, sollten andere *E. coli*-Stämme bezüglich der Expression von *PPA\_G1385236* getestet werden. Dafür wurden die Stämme *E. coli* Rosetta, Tuner und Origami 2 ausgewählt. *E. coli* Rosetta besaß in *E. coli* nicht übliche Basentriplets und könnte somit die Expression durch eine andere Codonusage beeinflussen. Bei *E. coli* Tuner hing die Expression abhängig von der IPTG-Konzentration ab. Dadurch lässt sich die Expressionsgeschwindigkeit beeinflussen. *E. coli* Origami 2 kann durch zusätzliche Chaperone die korrekte Faltung der gebildeten Proteine unterstützen.

Die Expressionen von *PPA\_G1385236* in *E. coli* Rosetta und Tuner lieferten ein ähnliches Ergebnis wie in *E. coli* BL21 (DE3). In allen Stämmen bildete sich ein Protein, welches auf einem SDS-Gel unterhalb von 55 kDa lag und nach Zellaufschluss nur in der unlöslichen Proteinfraction detektiert wurde (Abbildung 53).

Auch bei der Expression in *E. coli* Origami 2 ließ sich ein Protein unterhalb von 55 kDa feststellen, welches nach Zellaufschluss nur in der unlöslichen Proteinfraction zu finden war (Abbildung 54).

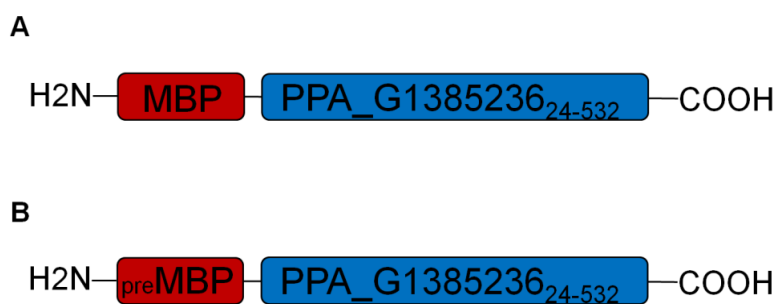


**Abbildung 53:** Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von *PPA\_G1385236* in *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta und Tuner. [A] Vor Induktion -IPTG und Ernte +IPTG. [B] lösliche (lös.) und unlösliche (unlös.) Proteinfraction. Die transformierten Zellen wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression fand bei 22 °C und 140 rpm statt und startete durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert. Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Es bildete sich ein Protein, welches eine Laufhöhe unter 55 kDa hat (schwarze Pfeile). Bei keinem Expressionsansatz ließ sich lösliches *PPA\_G1385236* detektieren. Die Abbildung wurde aus zwei SDS-Gelelmen zusammengesetzt, dabei wurden die Marker der beiden Gele aufeinander skaliert.



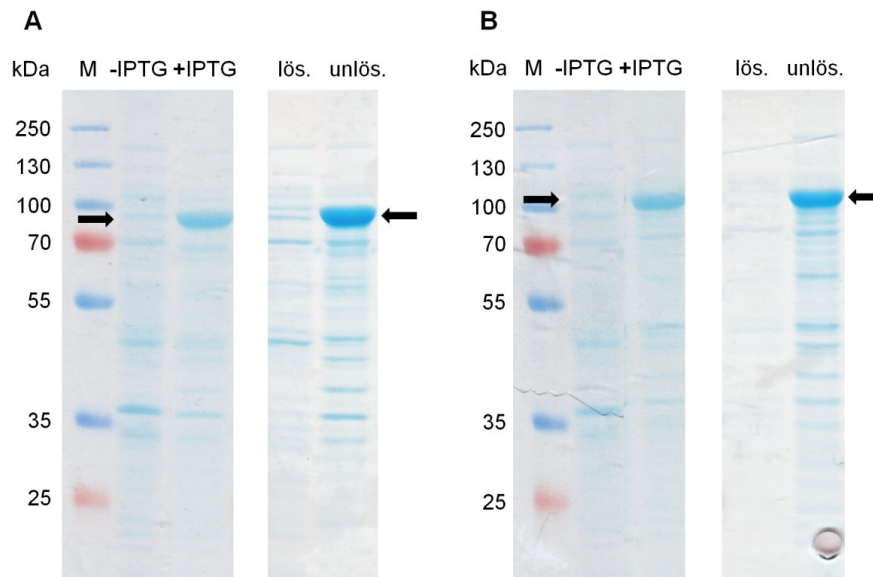
**Abbildung 54:** Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von *PPA\_G1385236* in *E. coli* Origami 2. Die transformierten Zellen wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression fand bei 22 °C und 140 rpm statt und startete durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert. Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Es bildete sich ein Protein, welches eine Laufhöhe unter 55 kDa hat (schwarze Pfeile). Es konnte kein lösliches *PPA\_G1385236* detektiert werden.

Da die Expression von *PPA\_G1385236* mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag in mehreren gängigen *E. coli*-Expressionsstämmen nur zu unlöslichem rekombinantem Protein führte, sollte versucht werden, durch die Fusion des Proteins mit dem maltosebindenden Protein (MBP) aus *E. coli* die Löslichkeit und die Faltung positiv zu beeinflussen. Dafür wurde ein Konstrukt mit N-terminalen MBP und C-terminalen *PPA\_G1385236* gebildet. Es wurden zwei verschiedene MBP verwendet: 1. Bei MBP ist die N-terminale Signalsequenz deletiert und dadurch blieb das Protein nach der Expression im Cytoplasma (Abbildung 55 A) 2. Bei preMBP war die Signalsequenz intakt und das Protein wurde nach der Expression in das Periplasma sekretiert, wo sich für das Protein eventuell wichtige Disulfidbrücken bilden könnten (Abbildung 55 B).



**Abbildung 55:** Schematische Darstellung der Fusionsproteine aus dem maltosebindenden Protein MBP aus *E. coli* (A), preMBP (B) und dem Glorinasekandidaten *PPA\_G1385236* zur Expression in *E. coli*. Bei MBP war die N-terminale Signalsequenz deletiert. Bei preMBP war die Signalsequenz intakt und führte nach der Expression zur Sekretion ins Periplasma von *E. coli*. Bei *PPA\_G1385236* wurde die N-terminale Signalsequenz deletiert.

Die Expression der Fusionsgene *MBP-PPA\_G1385236* und *preMBP-PPA\_G1385236* erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) bei 22 °C, 140 rpm und 4 h. Das Fusionsprotein MBP-*PPA\_G1385236* hat ein theoretisches Molekulargewicht von 100,5 kDa (42,5+58 kDa). Auf dem SDS-Gel konnte bei MBP-*PPA\_G1385236* eine Bande knapp unter 100 kDa und bei preMBP-*PPA\_G1385236* eine Bande knapp über 100 kDa detektiert werden. Somit passt die Laufhöhe auf dem SDS-Gel zum theoretischen Molekulargewicht. Nach dem Zellaufschluss ließ sich MBP-*PPA\_G1385236* eindeutig in der unlöslichen Proteinfraction erfassen. In der löslichen Proteinfraction konnte eine Bande detektiert werden, die dem rekombinanten Fusionsprotein zuzuweisen war (Abbildung 56 A). Bei preMBP-*PPA\_G1385236* konnte nach Zellaufschluss das rekombinante Fusionsprotein nur in der unlöslichen Proteinfraction identifiziert werden. Die Aufreinigung der löslichen Fraction von MBP-*PPA\_G1385236* mit einer Amylosesäule war aber nicht erfolgreich.



**Abbildung 56: Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von MBP-PPA\_G1385236 (A) und preMBP-PPA\_G1385236 (B) in *E. coli* BL21 (DE3).** Die transformierten Zellen wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression fand bei 22 °C und 140 rpm statt und startete durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert (MBP-PPA\_G1385236) oder mittels osmotischen Schocks laut MBP-Protokoll lysiert (preMBP-PPA\_G1385236). Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Es bildete sich jeweils ein Protein, welches eine Laufhöhe von ca. 100 kDa hat (schwarze Pfeile). Die Abbildung wurde aus zwei SDS-Gelen zusammengesetzt, dabei wurden die Marker der beiden Gele aufeinander skaliert.



### 3.11.2 Expression von *PPA\_G1286130* in *E. coli* BL21 (DE3)

Das Gen des Glorinasekandidaten *PPA\_G1286130* (*PPL\_01946*) sollte auch exprimiert und die Glorinaseaktivität des rekombinanten Proteins bestimmt werden. Das Konstrukt von *PPA\_G1286130* ähnelt dem von *PPA\_G1385236* in Abbildung 50. Die N-terminale Signalsequenz wurde deletiert und ein N-terminaler His<sub>6</sub>-Tag wurde eingeführt. Nach 4 h Expressionsdauer bei 22 °C bildete sich ein Protein, welches auf einem SDS-Gel unterhalb von 55 kDa läuft. Nach dem Zellaufschluss konnte diese Bande aber nur in der unlöslichen Proteinfraktion detektiert werden (Abbildung 57).

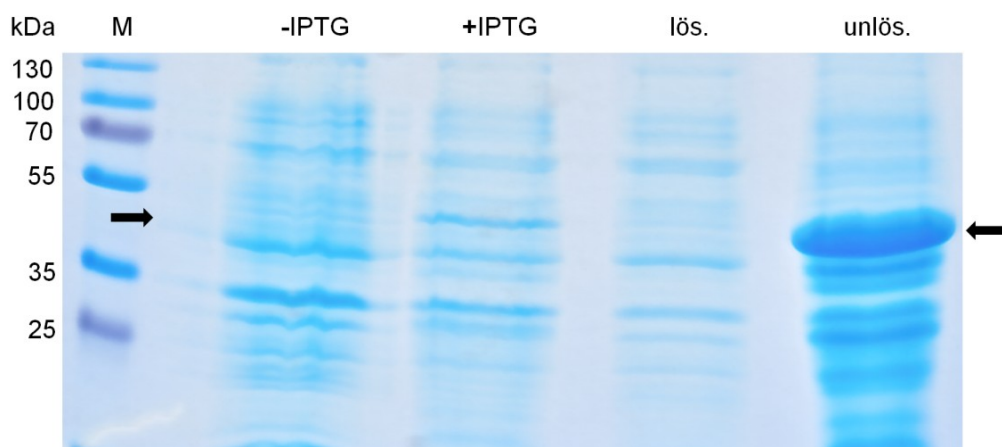
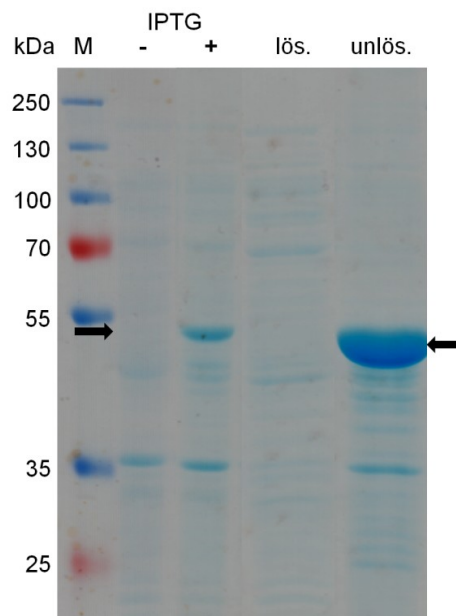


Abbildung 57: Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von *PPA\_G1286130* in *E. coli* BL21 (DE3). Die transformierten Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression fand bei 22 °C und 140 rpm statt und startete durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert. Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Ein Protein bildete sich, welches eine Laufhöhe unter 55 kDa hat (schwarze Pfeile). Es konnte kein lösliches *PPA\_G1286130* detektiert werden.

### 3.11.3 Expression von *PPA\_G1374042* (*PPL\_11291*) in *E. coli* BL21 (DE3)

Das Gen für den Glorinasekandidaten *PPA\_G1374042* (*PPL\_11291*) sollte auch exprimiert und die Glorinaseaktivität des rekombinanten Proteins bestimmt werden. Das Konstrukt von *PPA\_G1374042* ähnelte dem von *PPA\_G1385236* in Abbildung 50. Die N-terminale Signalsequenz wurde deletiert und ein N-terminaler His<sub>6</sub>-Tag wurde eingeführt. Nach 4 h Expressionsdauer bei 22 °C bildete sich ein Protein, welches auf einem SDS-Gel unterhalb von 55 kDa läuft. Nach dem Zellaufschluss konnte diese Bande aber nur in der unlöslichen Proteinfraction detektiert werden (Abbildung 58).

*E. coli*-Expressionsstämme scheinen ungeeignet um die identifizierten Glorinasekandidaten löslich zu exprimieren.



**Abbildung 58:** Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE von *PPA\_G1374042* in *E. coli* BL21 (DE3). Die transformierten Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert (-IPTG). Die Expression fand bei 22 °C und 140 rpm statt und startete durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 4 h Expressionsdauer (+IPTG). Die Zellen wurden in Lysispuffer 3x30 s sonifiziert. Die löslichen Proteine (lös.) wurden von den unlöslichen Proteinen (unlös.) durch Zentrifugation (15000 g, 30 min) getrennt. Ein Protein bildete sich, welches eine Laufhöhe unter 55 kDa hat (schwarze Pfeile). Es konnte keine lösliches *PPA\_G1374042* detektiert werden.



### 3.11.4 Expression in *Dictyostelium discoideum* AX2

Da die bakterielle Expression von Glorinasekandidaten nur unlösliche Proteine ergab, erfolgte als Alternative die Expression in dem zu *P. pallidum* phylogenetisch verwandten Organismus *D. discoideum* AX2. *D. discoideum* wurde ausgewählt, da dieser Organismus als Modell für biologische Fragestellungen innerhalb der sozialen Amöben dient und die heterologe Expression von Proteinen (vor allem Glykoproteinen) bestens etabliert ist [85, 86]. Dafür wurden das vollständige Gen inklusive der nativen Signalsequenz für die Sekretion sowie eine artifizielle Sequenz für einen C-terminalen Flag-Tag in einem pDM304-Expressionsvektor kloniert. Dieser Vektor codierte eine G418-Resistenz mit der auf positive Transformanden selektioniert wurde. Des Weiteren wurde durch den Promoter des Actin-15-Gens (A15P) das Zielgen konstitutiv exprimiert. Durch die intakte N-terminale Signalsequenz wurde das Protein durch *D. discoideum* in das umgebende Medium sekretiert. In Abbildung 59 ist das Protein schematisch dargestellt.

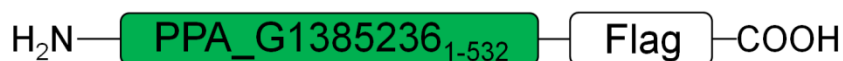
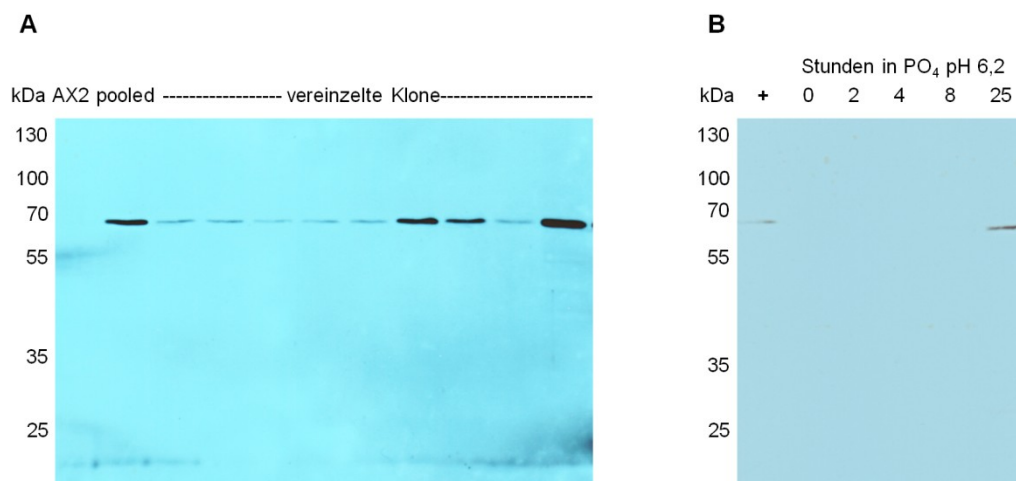


Abbildung 59: Schematische Darstellung des Konstruktes für den Glorinasekandidaten *PPA\_G1385236* zur Expression in *Dictyostelium discoideum* AX2. Es wurde das Protein mit intakter N-terminaler Signalsequenz und C-terminalem Flag-Tag für die Detektion produziert.

Die transformierten *D. discoideum* wurden in HL5<sub>G418</sub> bei 22 °C in Petrischalen kultiviert. Nach ca. 7 Tagen wurde HL5-Medium entnommen und die enthaltenen Proteine wurden mit SDS-PAGE und Western-Blot auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert. Anschließend wurde *PPA\_G1385236* mit einem gegen den C-terminalen Flag-Tag gerichteten Antikörper detektiert. Alle untersuchten Transformanden sekretierten das gebildete Protein in das Medium: Es konnte bei einer Laufhöhe von ca. 70 kDa erfasst werden. Dies entsprach auch der Laufhöhe des nativen identifizierten *PPA\_G1385236* (siehe Abbildung 45). In Medium, das von nicht transformiertem *D. discoideum* AX2 gewonnen wurde, ließ sich diese Bande nicht nachweisen werden (Abbildung 60 A). Nach dem Waschen von positiven Transformanden in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2, d.h. unter Hungerbedingungen, konnte nach 25 h sekretiertes *PPA\_G1385236* ermittelt werden (Abbildung 60 B). Somit war *D. discoideum* in der Lage *PPA\_G1385236* in löslicher Form zu exprimieren und zu sekretieren. Des Weiteren konnten trotz der langen Kultivierung auch nach 7 Tagen keine Degradierungsprodukte des rekombinanten Proteins detektiert werden.



**Abbildung 60:** Expressionsanalyse mittels Western-Blot von PPA\_G1385236 in *D. discoideum* AX2. Die transformierten Zellen wurden in Petrischalen in HL5<sub>G418</sub> (A) oder 17 mM Phosphatpuffer pH 6,2 (B) bei 22 °C inkubiert. Das HL5<sub>G418</sub> oder der Phosphatpuffer wurde direkt mit Laemmli-Puffer versetzt und mittels SDS-PAGE/Western-Blot analysiert. Der Nachweis erfolgte mit einem gegen den C-terminalen Flag-Tag gerichteten Antikörper.

Für die Reinigung von rekombinanten PPA\_G1385236 mittels Anionenaustauschchromatographie (AAC) wurde ein größerer Expressionsansatz in HL5<sub>G418</sub> gewählt, da es unter diesen Bedingungen keine Limitierung der Kultivierungsdauer gibt und so ausreichend Protein gebildet werden konnte. Die Zellen wurden bis zum Übergang in die stationäre Phase in HL5<sub>G418</sub> bei 22 °C und 100 rpm kultiviert. Das Medium wurde anschließend bei 150 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit einer Vivaspin Turbo® 15 (MWCO 10 kDa) auf 20 mM Tris/HCl pH 8,0 umgepuffert. Die Proteinlösung wurde auf eine HiTrap Capto Q aufgetragen und nach 5 Säulenvolumen Waschen mit Bindepuffer wurde ein linearer Gradient von 0-100 % Elutionspuffer (1 M NaCl) in 30 min angelegt. Während des Gradienten wurden 1 mL-Fractionen gesammelt und diese mittels SDS-PAGE/Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran immobilisiert. Anschließend erfolgte die Immunodetektion des C-terminalen Flag-Tags von PPA\_G1385236. Das rekombinante Protein konnte mittels AAC erfolgreich in 3 Fractionen (Fraction 12-14) konzentriert werden. Mittels Immunodetektion ließ sich nur eine Spezies von PPA\_G1385236 bei ca. 70 kDa identifizieren. Somit wurde das gereinigte rekombinante Protein nicht degradiert. Fraction 12 enthielt laut Immunodetektion das meiste gereinigte Protein (Abbildung 61).

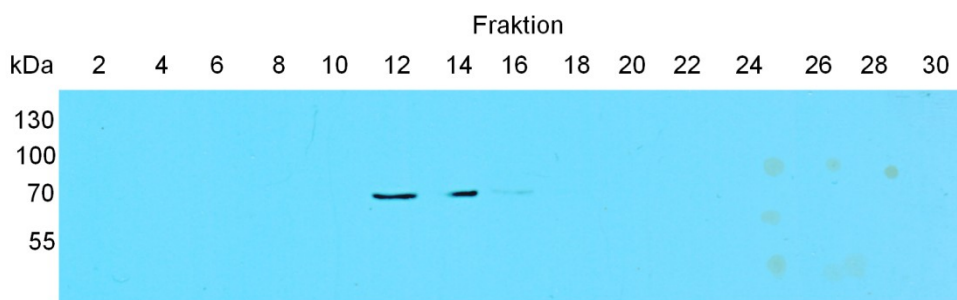
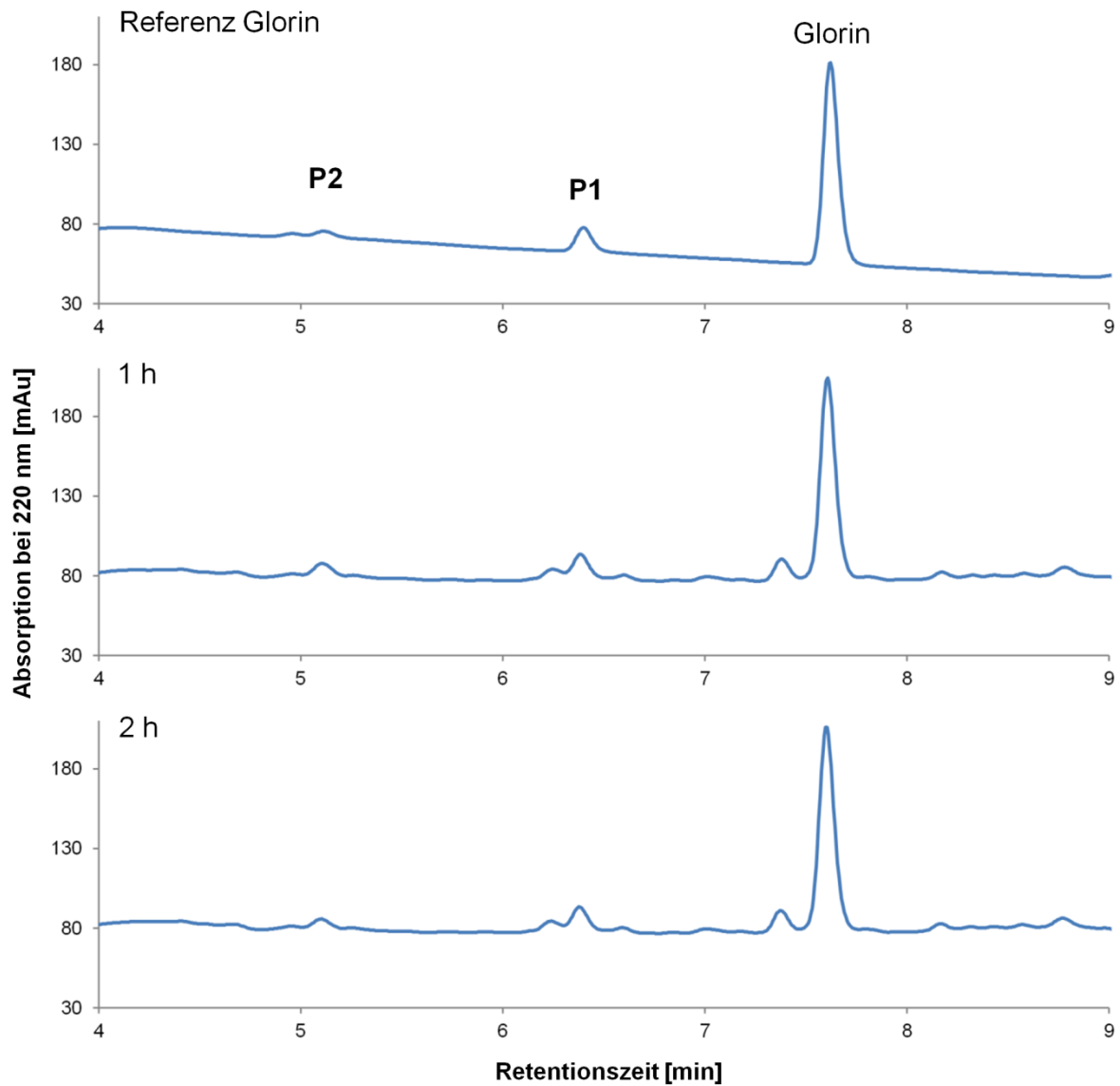


Abbildung 61: Western-Blot der Reinigung von PPA\_G1385236 (sekretiert in HL5) mittels Anionenaustauschchromatographie. Das proteinangereicherte HL5-Medium wurde mit einer Vivaspin Turbo® 15 (MWCO 10 kDa) auf 20 mM Tris/HCl pH 8,0 umgepuffert. Die Proteinlösung wurde auf eine HiTrap Capto Q CV 1 mL aufgetragen und mit 5 CV BP gewaschen, gefolgt von einem linearen Gradienten von 0-100 % EP (1 M NaCl) in 30 min. Während des Gradienten wurden 1 mL-Fractionen gesammelt.

### 3.11.5 Glorinaseaktivität von gereinigtem rekombinanten PPA\_G1385236

Um das rekombinante Protein zweifelsfrei als Glorinase zu identifizieren, musste gezeigt werden, dass Glorin durch das gereinigte Enzym zu **M1** hydrolysiert wurde. Dafür wurde die Fraktion 12 verwendet. Es erfolgten eine Referenz (300  $\mu$ M Glorin) und 2 Glorinase-Assays in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 für eine und zwei Stunden. In der Referenzprobe eluierte Glorin bei 7,6 min und es fanden sich zwei zusätzliche Peaks bei einer Retentionszeit von 6,4 min (**P1**) und 5,1 min (**P2**). Die Peaks **P1** und **P2** könnten durch Autohydrolyse bei einem pH-Wert von 8,0 entstanden sein, da Glorin bei höheren pH-Werten eine geringere Stabilität besaß (siehe Abbildung 11), aber **P1** schien in dieser Menge eher als Verunreinigung vorzuliegen. Nach einer oder zwei Stunden Reaktionszeit von Fraktion 12 mit 300  $\mu$ M zugesetztem Glorin zeigte sich keine deutliche Bildung von **M1** und auch keine deutliche Abnahme von Glorin (Abbildung 62). Somit konnte das gereinigte rekombinante Protein PPA\_G1385236 Glorin nicht zu **M1** enzymatisch hydrolysieren. Es könnte sein, dass das Protein trotz Löslichkeit nicht richtig gefaltet war und deswegen kein Glorin abbauen konnte. Falls PPA\_G1385236 nur ein Teil der aktiven Glorinase (Proteinkomplex oder Kofaktoren) sein sollte, könnte Glorin auch nicht von dem rekombinanten PPA\_G1385236 degradiert werden. Es könnte aber auch sein, dass PPA\_G1385236 nicht die Glorinase war und dann wäre Glorin nicht das Substrat für diese Carboxylesterase.



**Abbildung 62:** Bestimmung der Glorinaseaktivität des gereinigten rekombinanten Glorinasekandidaten PPA\_G1385236. PPA\_G1385236 wurde in *D. discoideum* exprimiert und mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Der Glorinase-Assay erfolgte in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 22 °C für 1 h bzw. 2 h. Es konnte keine enzymatische Bildung von M1 beobachtet werden.

### 3.12 Biosynthese von Glorin

Bei einem Vergleich von Glorin und Glutathion fallen einige strukturelle Ähnlichkeiten auf. Wie vorher schon erwähnt, ist Glorin ein Dipeptid aus Glutaminsäure und Ornithin- $\delta$ -lactam, welches durch Ethanol und Propionsäure an der Carboxyl- und Aminofunktion blockiert ist. Glutathion ist ein Tripeptid aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Beide Verbindungen beinhalten also eine Glutamyleinheit, deren  $\gamma$ -Carboxylfunktion eine Amidbindung mit Ornithin- $\delta$ -lactam bzw. Cysteinylglycin bildet.

Die Biosynthese von Glutathion und der Glutathionzyklus wird von vier Enzymen bewerkstelligt. Die  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthetase bindet Cystein über das  $\gamma$ -Carbonyl an Glutamat und es entsteht  $\gamma$ -Glutamylcystein. Im nächsten Schritt entsteht durch Bindung von Glycin durch die Glutathion-Synthetase Glutathion. Extrazellulär wird Glutathion durch die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT) zu Cysteinylglycin und einem Glutamat-Aminosäure-Konjugat gespalten. Im vierten Schritt spaltet sich das Cysteinylglycin durch eine Dipeptidase zu Cystein und Glycin (Abbildung 63) [87].

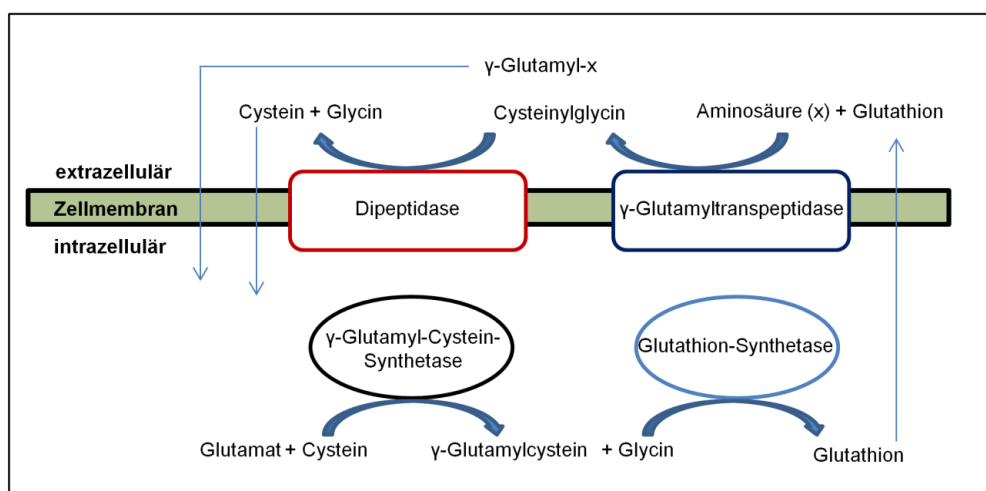


Abbildung 63: Vereinfachter  $\gamma$ -Glutamylzyklus (Glutathionzyklus). Abbildung modifiziert nach [87].

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Glutathion und Glorin postulierte Ashma Asghar, dass die Glorinbiosynthese in Analogie zum Glutathionzyklus ablaufen könnte [46]. Diese Hypothese sollte genauer untersucht werden. Im Folgenden werden Daten präsentiert, die zum Teil im Verlauf einer Masterarbeit von Nicole Duckwitz erstellt wurden [88]. Es sollte ermittelt werden, ob *P. pallidum* eine  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase besitzt, die in der Lage wäre, die Glutaminsäure von Glutamyl-*p*-nitroanilid auf Ornithin oder Ornithin- $\delta$ -lactam zu übertragen.

### 3.12.1 Identifizierung und bioinformatische Charakterisierung von $\gamma$ -GTs in *P. pallidum*

Mit dem Referenzgen  $\gamma$ -GT aus *E. coli* (UniProt P18956) wurden verschiedene vorhandene Genomsequenzen der sozialen Amöben nach  $\gamma$ -GT durchsucht. Blastp-Analysen konnten in *D. discoideum* und *P. violaceum* kein Gen einer  $\gamma$ -GT identifizieren. *D. discoideum* nutzt als Acrasin cAMP. Somit wäre keine  $\gamma$ -GT für die Glorinbiosynthese nötig. Das Acrasin für *P. violaceum* ist Glorin. Daher sollte laut Hypothese eine  $\gamma$ -GT für die Glorinbiosynthese vorhanden sein. In *D. fasciculatum*, *D. lacteum* und *A. subglobosum* ließ sich jeweils ein Gen für eine  $\gamma$ -GT identifizieren. In *P. pallidum* wurden fünf paraloge Vertreter der  $\gamma$ -GT gefunden. Die Sequenzen des Referenzproteins aus *E. coli* und die erfassten  $\gamma$ -GTs aus *D. fasciculatum* und *P. pallidum* wurden miteinander verglichen (Abbildung 64), um daraus einen phylogenetischen Stammbaum zu erstellen. Durch das Alignment konnte das hochkonservierte Threonin, welches die Spaltung der  $\gamma$ -GT in die große und kleine Untereinheit katalysiert [89], ermittelt werden (rotes Rechteck in Abbildung 64).



```

PPA_G1318746 1 -----NFLYN--YDNRSFVISING
DFA_G1571190 1 -----MFKENDDYSSRSPLVATNG
PPA_G1430570 1 -----MNILRDYDORSPIVAING
PPA_G1430538 1 -----MNILRDYDORSPIVAING
PPA_G1314044 1 -----MLFYKKCIFLY-----ILLVFINKIDCN-----STPEVTSGWYKKEKYSKEF
PPA_G1313948 1 MQRFNGLIYILLCFVYSCYEVQFFVFAYVLEVNGEAKLAALPESSGWYKKEKYSKEF
GGT_E.coli 1 -----MIKPTFLRRVAIAALLSGSCFSAAAAPPAPPVSYGVEEDVFHVRARQOG

PPA_G1318746 18 ICGSSOPLASOVGIDILKSGGNAADAAVAMAATLNLTOPCSTGIGGDCFVLYYNNITKKV
DFA_G1571190 20 VCSSSOPLASOVGIDILKSGGNAADAAVAMAAMNLTOPCSTGIGGDCFMIIYDAKTKEI
PPA_G1430570 19 ICATSOPLASOVGIDILKSGGNAADAAVAMAATLSLSTEPYSTGLGGDCVVMFVNNKTKEI
PPA_G1430538 19 ICATSOPLASOVGIDILKSGGNAADAAVAMAATLSLSTEPYSTGLGGDCVVMFVNNKTKEI
PPA_G1314044 44 MVVSAHPLATKACGYDIINMGNAIDAMIAVOLVNLVVEPOSSGIGGGSYLIYFDKKNDKL
PPA_G1313948 61 MVVSAHPLATKACGYDIINMGNAIDAMIAVOLVNLVVEPOSSGIGGGSYLIYFDKKNDKL
GGT_E.coli 50 MVAIVDATAIVQGVVDILKSGGNAVDAVAVGYALAVTHPQAGNIGGGGFMILIR-SKNGNT

PPA_G1318746 78 SGINGSGRAPSKLTLDLIRERINGNS---IPFDSPLAITVPGAAAGWCDTVEHFGSGKL
DFA_G1571190 80 HGMNNGSGRAPEALTLOLVKEKGITGDC---LPPYSALTVTVPGAAAGWCDTIEKFGSGKL
PPA_G1430570 79 SSINGIGRSPMNLTLDSLESKDKRCGDO---FHTRSVHAVTVPGAAAGWCDTIKQYGSNDL
PPA_G1430538 79 SSINGIGRSPMNLTLDSLESKDKRCGDO---FHTRSVHAVTVPGAAAGWCDTIKQYGSNDL
PPA_G1314044 104 LSFQDRETAFSGVTEKFFNQTTNQPFTFIEALVGGSSVGVPGTLKLMHVHVSQFG--KL
PPA_G1313948 121 TSYDQRETAPRRATETLFYNKTTSPQSFTFIEALVGGSSVGVPGTLKLMHVHVSQFG--KL
GGT_E.coli 109 TADDFREMAPAKATRDMLDDQGNPDSK--KSLTSLHAGTPTGTVAGFSLALDKYG--TM

PPA_G1318746 135 SFOQILQPAIDYCEOGVPIHITSQDWNANAYQLERSENAG-----ELKIDGKAPVVGDI
DFA_G1571190 137 TMTDILTPAIEYCELVGPIQSKTSMWNEASMDQLMTGPHSS-----ELLINGOPPKPGQI
PPA_G1430570 136 KLSQIFOPATIDYCEOGVPIQVKTSTFLWRFSR--LKPDNAN-----ELLCDGKKPEIGDT
PPA_G1430538 136 KLSQIFOPATIDYCEOGVPIQVKTSTFLWRFSR--LKPDNAN-----ELLCDGKKPEIGDT
PPA_G1314044 162 PWKVFQPAIKLCTDGFPIGNRLATMLAMEKYKPKLLKDPESRKFYFN--SDLTPKKKEQI
PPA_G1313948 179 PWSVLFQPAIRLCLVGFPIGHLAFLIKTN---PDLKKDPDSRDHFYHKEDGSKKEGET
GGT_E.coli 165 PLNKVVQPAFKLARDGFIVNDALADDLKTGYSEVLPHNENSK---AIFWKEGELKKGDT

PPA_G1318746 190 FKNPTLANTRFLAKHGKDG-FYKGSVADATIKVINNLG---GVMTHSDLENHSTSLDTP
DFA_G1571190 192 FKNPNLAKTFKLAKHGKDG-FYKGETANEIVKVIKELG---GVLSLKDLNHRKTFQKP
PPA_G1430570 189 LTNVPLSNCLKLAKHGKDG-FYKGEVADSTIKAIQDHG---GLMTHADLESHKSTYDKP
PPA_G1430538 189 LTNVPLSNCLKLAKHGKDG-FYKGEVADSTIKAIQDHG---GLMTHADLESHKSTYDKP
PPA_G1314044 221 LKNYKLAKVFORHSLGSDAGFYNGETASKIVAKVKNHPTNPGFLEMEDLRKYQIKSTTP
PPA_G1313948 226 LKNYKLAKVFORHSLGSDAGFYNGETASKIVAKVKNHPTNPGFLEMEDLRKYQIKSTTP
GGT_E.coli 222 LVQANLAKSLEMTAENGPEDE-FYKGTIAEQIAQEMQKNG---GLITKEGLAAYNAVERTP

PPA_G1318746 246 ISVNYRGYNVYEMPPNG-OGLTVLLALRILEGFDLSKLDP-----
DFA_G1571190 248 IHIYNYRGYDIFETPPNG-OGITALLALNLEBEYKLEMN-----
PPA_G1430570 245 ISVNYRGYQIYELPPTS-OGITSLMALNILEGFEEMNKYEP-----
PPA_G1430538 245 ISVNYRGYQIYELPPTS-OGITSLMALNILEGFEEMNKYEP-----
PPA_G1314044 281 ICHDQKNTVCTTRP---SGIILLQILGILDPLPKYRIENLPPTLENIDNFGKY---Y
PPA_G1313948 286 LCRDYSQSVETCSTPPES-GGIVLLQILGILDRLPQDKRIENLPNNVSFGAFNDFQPSY
GGT_E.coli 278 ISGDYRGYQVYSMPSPSGGIHIVQILNILENEDMKKYGFG-----

PPA_G1318746 285 -LSDQHTLLIEAHLRSLFADTRYVADPEFSKVPIDELLSEYAESRRSLINEYHSNRTI
DFA_G1571190 287 -YSKEHLHLLIESLRISFSDTRYVADPAFYDAPLDKMLSEYAEERRKLVDKECNKNV
PPA_G1430570 284 -ISDQHTLLIESMRLSFADAFSFSVSDTEFSTIPIDELLSKDYAASRRSLINEYKANDNI
PPA_G1430538 284 -ISDQHTLLIESMRLSFADAFSFSVSDTEFATIPIDELLSKDYAASRRSLINEYKANDNI
PPA_G1314044 334 QPTTALHIFSEASKLAFADRNRVLAIDLNL---WDLFLEKKYL--ERSALITEKSLGQAV
PPA_G1313948 355 OPTPRAMHLFAEACKLAFADRNRVLAIDLNL---WDLFLEKKYL--ERSALITEKSLGQAV
GGT_E.coli 319 --SADAMQIMAEAEKYAVADRSEYLGDPDFVVKVFWQALTNKAYAKSIADQHDINAKPSS

PPA_G1318746 344 DKGYPTN-----GSNTIYLSVADKDGNAACSFINSNYTGFGSGIIPKGGC
DFA_G1571190 346 EKGYPTN-----SSNTIYLTAVDRDGNACSFINSNYMSFGTCIIPKGGC
PPA_G1430570 343 QNGYPLN-----SSNTVCASVVDKDGNVCLFNSVFSEFGSGIIPKGGC
PPA_G1430538 343 QNGYPLN-----SSNTVCASVVDKDGNVCLFNSVFSEFGSGIIPKGGC
PPA_G1314044 490 AGKFTREQLLGNSFKEGHS--HEFPCTSHISIVDKKESVMSMTTSIENGFGSTLMVEGFL
PPA_G1313948 412 AGSFTRDQLLVNKSESGDQPPHEFPCTSHISIVDRDGNASILTTSIEHEFGSSIMVEGFL
GGT_E.coli 377 EIRPGKLAP-----YESNCTHYSVVDKDGNAVAVTYTLNTTFGTGIVAGESG

PPA_G1318746 388 FTLHNR-----GANFVLDETHPNCLKPNKRPYHTIIPSMITDKY-----GEL
DFA_G1571190 390 FTLQNR-----GANFSLDPSHPNSLOPNKRPYHTIIPGMILKD-----GOL
PPA_G1430570 387 LVQPCSSK-----SCWFNLDNRNHPNCLQPKRPYHTVMPTMILDKD-----GEF
PPA_G1430538 387 FALQNR-----GCWFNLDNRNHPNCLQPKRPYHTVMPTMILDKD-----GEF
PPA_G1314044 448 LNNQLTDFSF-----DPYDVKDQCSVANQKVPNKRPRSSMSPTLVFKKHEDTSNRGRKSL
PPA_G1313948 472 LNNQLTDFNF-----IYDDNTQCSFANKVRPNKRPRSSMSPTLVFKKYNDNNRSQ--L
GGT_E.coli 425 ILLNNQMDDFSAPKGPVNVYGLVGGDANAVGPNKRPLSSMSPTIIVVKDG-----KT

PPA_G1318746 430 YASFQVMGKFIQPOAQVQTIIVNLIDHKMDPOAALSHPRFMTDGGDHPSEVYFEPEFAN-I
DFA_G1571190 431 FASFQSMGGFIQPOSHVOLIVNLIDHKMDPOAALSHPRFMTSDGESNGRIFEDGHQEEN
PPA_G1430570 432 LCIDRNNRRRCGPTCCQCSNRRQFNRRSSMDPOTVLNPFRFRLEKN---GVIIYEPALEN-T
PPA_G1430538 429 YASIGIGGIQPVANVQAIIVNLIDHKMDPOTILNFRFRLENSPRYGLIDYESDFEN-T
PPA_G1314044 503 LMSIGSAGGPTIPLTIASIVASMNWGITLQDSFNMNLFSGINQNAQILIELG-----
PPA_G1313948 525 VMSIGAAGGPLIPMVLGKSIITATLNWGISLQDSFNMVNFSGDNRFGLSAVEIG-----
GGT_E.coli 476 WLVTGSPGGSRIITTVLQMVVNSIDYGLNVAEATNAPRFHHQWLPELDRVEKGFSPDT--

PPA_G1318746 489 LESLKKRGHNIGLEPAH---RHIFGNGOVIVSKLNNQNRILTAGSDNRCDGVATSY
DFA_G1571190 491 IKGLKMGHNVQLGPVKGHDRRIFGNGOIVQLTDENQNRICYCSGTDNRCDGISSIVY
PPA_G1430570 488 FSKMKERGONVGDKNVET---RYTFGLGQIIVFAKKNNQNTVLTAGSDNRSDGIVIGY
PPA_G1430538 488 FSKMKERGHNIG-SILEA---RIHFGMGQIIVVKKNNQNTVLTAGSDNRSDGIATGY
PPA_G1314044 556 ---RINKTNIDILKNQYGHENINYLELSTGLQIGIMYDDKEKCVGASDPRKEGAMGI
PPA_G1313948 578 ---HLNQTFLTQLEQFGQK-IFQFGSPTGMQGFYTDTKSKTYTAGSDPRKEGAMGD
GGT_E.coli 534 LRLLEAKGQKVALKEAMG-----STQSIMVGPDGELYGASDPRSVDDLTAGY

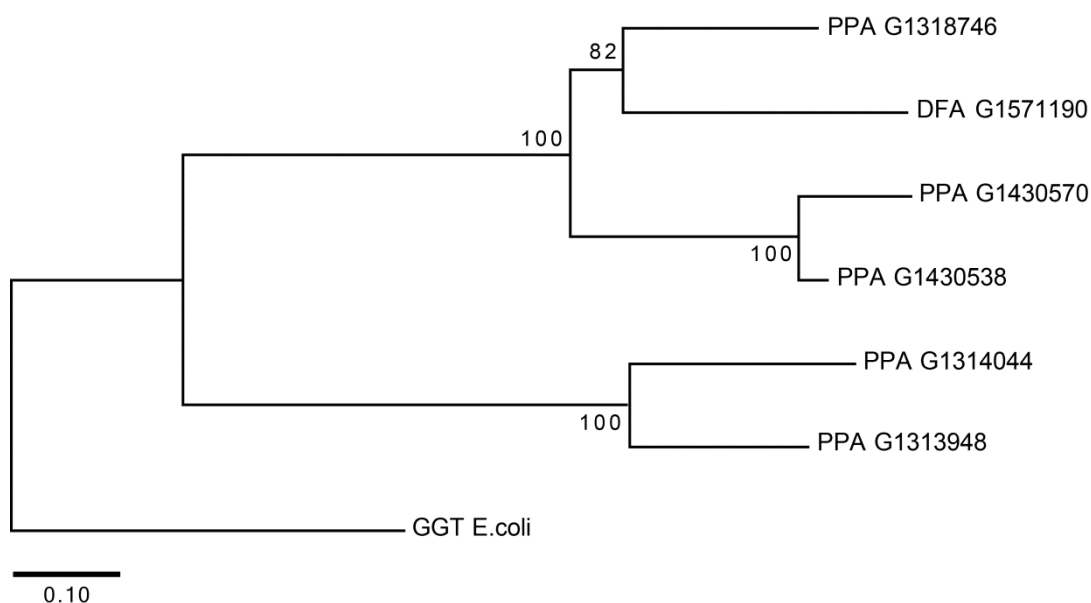
```

Hochkonserviertes  
Threonin

Abbildung 64: Sequenzalignment der identifizierten  $\gamma$ -GT-Kandidaten aus *P. pallidum* und *D. fasciculatum* mit der Referenz- $\gamma$ -GT aus *E. coli* (UniProt P18956). Das Alignment wurde mit Clustal X [90] und mit BoxShade ([https://embnet.vital-it.ch/software/BOX\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html)) erstellt.

Der Stammbaum zeigte, dass die  $\gamma$ -GT aus *E. coli* eine Außengruppe zu den anderen sechs Sequenzen bildet. Die sechs  $\gamma$ -GTs spalten sich in zwei Schwestergruppen auf, wobei eine Gruppe aus den zwei Proteinen PPA\_G1313948 und PPA\_G1314044 besteht. Die restlichen vier Sequenzen spalten sich wiederum in zwei Schwestergruppen mit jeweils zwei  $\gamma$ -GTs auf. Eine umfasst die zwei Proteine PPA\_G1430538 und PPA\_G1430570. Die zweite Gruppe besteht aus der  $\gamma$ -GT aus *D. fasciculatum* DFA\_G1571190 und PPA\_G1318746 (Abbildung 65).

Aufgrund der Nähe zu dem orthologen Protein aus der Spezies *D. fasciculatum*, die ebenfalls chemotaktisch auf Glorin reagiert [46], wurde PPA\_G1318746 ausgesucht, um die Hypothese zu überprüfen, dass ein Schritt der Biosynthese von Glorin von einer  $\gamma$ -GT bewerkstelligt werden könnte. Des Weiteren liegt in PPA\_G1318746 keine Signalsequenz vor, d.h., das Protein sollte nicht membrangebunden und somit im Cytosol vorliegen. Das Protein besitzt laut Sequenz ein Molekulargewicht von 60,5 kDa. Die  $\gamma$ -GTs unterliegen einer autokatalytischen Spaltung am hochkonservierten Threonin (hier T354), wodurch bei PPA\_G1318746 eine große Untereinheit mit 39,5 kDa und eine kleine Untereinheit mit 21,0 kDa entstehen sollte. Das Auftreten dieser Spaltung bei der Expression von PPA\_G1318746 wäre somit ein Hinweis auf die Bildung einer aktiven Konformation.



**Abbildung 65:** Phylogenetischer Stammbaum der ausgewählten Proteine der  $\gamma$ -GT, PPA aus *P. pallidum*, DFA aus *D. fasciculatum* und *E. coli* (P18956). Der Stammbaum wurde aus einem Alignment erstellt mit ClustalX nach dem Neighbor-Joining-Verfahren generiert. Gezeigt wird der optimale Baum mit einer Gesamtlänge von 2.67872054. Die Häufigkeit dieses Stammbaums wurde mit dem Bootstrap-Test bestimmt (1000 Wiederholungen) und findet sich neben den Nodi.



### 3.12.2 Expression und Reinigung der $\gamma$ -GT PPA\_G1318746

Das Gen (*PPA\_G1318748*) wurde durch Eurofins Genomics mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag synthetisiert. Dieses Gen wurde in einem pET33b(+)-Vektor kloniert und in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Die Expression wurde bezüglich der IPTG-Konzentration sowie der Expressionstemperatur und -dauer optimiert [88]. Die optimalen Bedingungen waren wie folgt: Induktion bei OD<sub>600</sub> 0,6-0,8, IPTG-Konzentration 0,1 mM, Expressionstemperatur 22 °C und Expressionsdauer 14 h. Bereits nach 14 h Expressionsdauer konnten alle drei Proteine (gesamt, große Untereinheit und kleine Untereinheit) in der Zelle detektiert werden. Nach dem Zellaufschluss waren die große und kleine Untereinheit sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Proteinfraction identifizierbar (Abbildung 66). Es wurde ein aktives Protein gebildet, da die autokatalytische Funktion der  $\gamma$ -GT bereits in der Zelle vorhanden war.

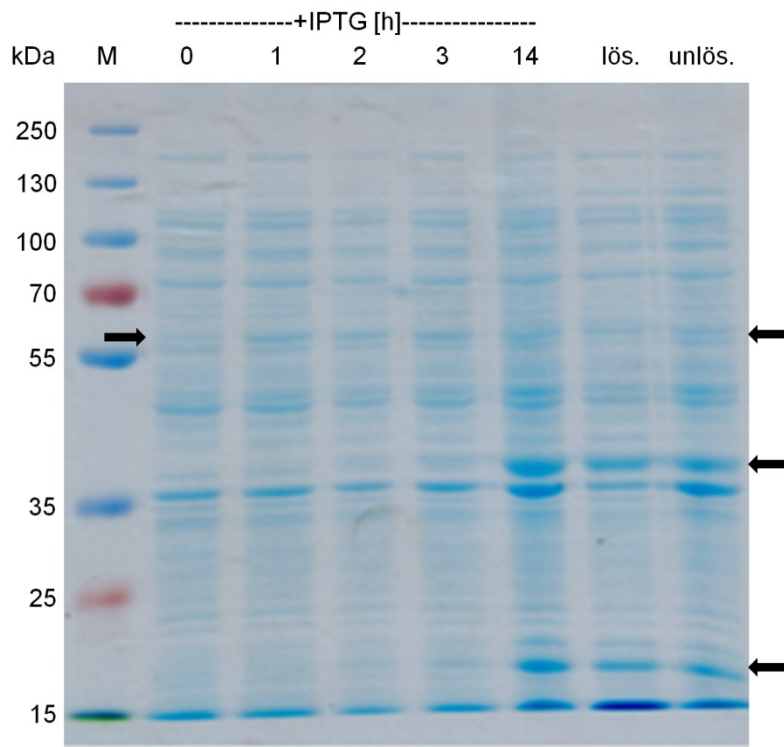


Abbildung 66: Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE des Gens  $\gamma$ -gt PPA\_G1318746 in *E. coli* BL21 (DE3). Die Pfeile zeigen die Laufhöhe der drei Spezies von PPA\_G1318746. 1.: unprozessiertes Protein 60,5 kDa, 2.: große Untereinheit 39,5 kDa und 3.: kleine Untereinheit 21 kDa

Die Reinigung erfolgte mittels Metallaffinitätschromatographie über den N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag. Nach dem Probenaufruf und Waschen der an die Säule gebundenen Proteine wurden diese mit 250 mM Imidazol eluiert. Es zeigte sich, dass die zwei Untereinheiten trotz Spaltung aggregiert waren, da neben der unprozessierten  $\gamma$ -GT beide Untereinheiten in den Elutionsfraktionen vorhanden waren. Somit war neben der Entsalzung durch Dialyse kein weiterer Reinigungsschritt nötig.

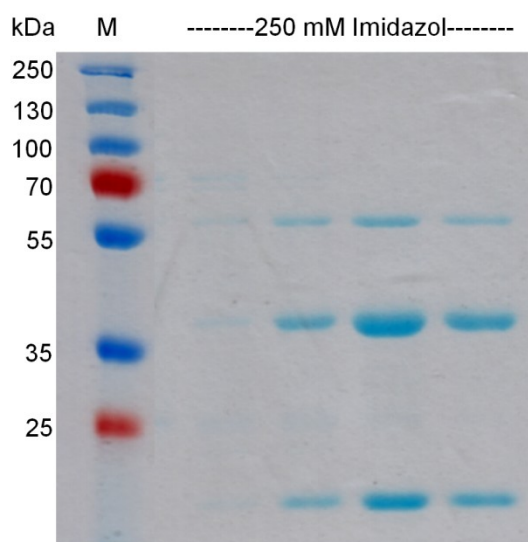
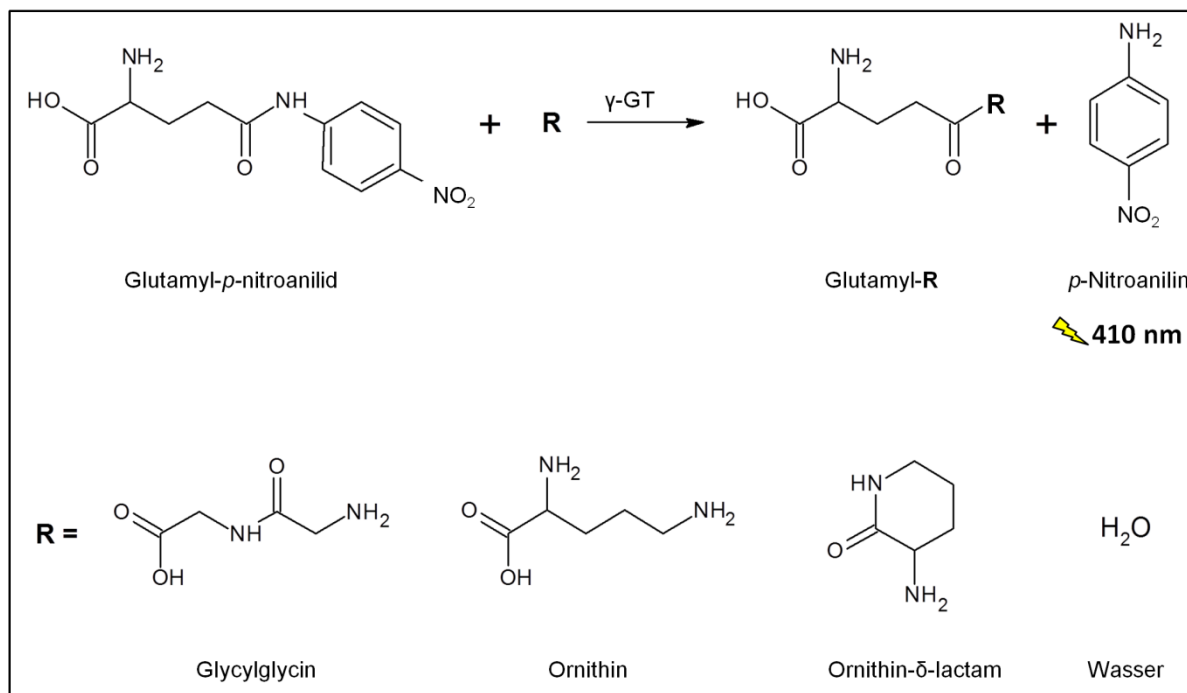


Abbildung 67: Elutionsfraktionen (250 mM Imidazol) der Aufreinigung der exprimierten  $\gamma$ -gt PPA\_G1318746. Die Reinigung erfolgte mittels Metallaffinitätschromatographie (nickelbeladene HiTrap Chelating HP CV 1 mL) über den N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag. Nach Probenaufruf, wurden die gebundenen Proteine gewaschen. Die Elution erfolgte durch 250 mM Imidazol im Bindepuffer. Alle drei Spezies der  $\gamma$ GT wurden in den Elutionsfraktionen detektiert.

### 3.12.3 Photometrischer $\gamma$ -GT-Aktivitätstest

Der photometrische Aktivitätstest für das rekombinante Enzym PPA\_G1318746 erfolgte nach Orlowski und Meister [77]. Glutamyl-*p*-nitroanilid wird durch die  $\gamma$ -GT in *p*-Nitroanilin und einen Glutamylrest gespalten. Der Glutamylrest wird durch einen Akzeptor (Substrat mit freier Aminogruppe) unter Ausbildung einer neuen Amidbindung oder durch Anlagerung von Wasser vom Enzym gespalten [91]. Der letzte Fall ist eine klassische Hydrolyse, bei der Glutamat entsteht, während sich im ersten durch eine Transpeptidierung ein neues Peptid bildet. Hier wurden als Akzeptor Glycylglycin, Ornithin und Ornithin-1,5-lactam verwendet. Zur Negativkontrolle blieb die Zugabe eines Glutamylakzeptors aus. Als Produkte einer erfolgreichen Reaktion entstünden Glutamylglycylglycin, Glutamylornithin und Glutamylornithin- $\delta$ -lactam

(Abbildung 68). Die letztere Verbindung könnte eine direkte Vorstufe zum Glorin sein. Da *p*-Nitroanilin ein Absorptionsmaximum bei 410 nm besitzt, konnte der Reaktionsverlauf mittels Vis-Spektroskopie analysiert werden.



**Abbildung 68: Photometrischer Aktivitätstest der  $\gamma$ GT:** Glutamyl-*p*-nitroanilid wird durch die  $\gamma$ -GT in Glutamat und *p*-Nitroanilin gespalten. Bei Anwesenheit eines Akzeptors (Substrat mit freier Aminogruppe) kommt es zur Bildung einer neuen Amidbindung zwischen dem Glutamylrest und der Aminogruppe des Akzeptors. Liegt kein geeignetes Substrat vor, findet eine Hydrolyse unter Bildung von Glutamat statt. *p*-Nitroanilin besitzt ein Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge von 410 nm, sodass die Reaktion mittels Vis-Spektroskopie analysiert werden konnte. Als Glutamylakzeptor dienten Glycylglycine, Ornithin, Ornithin- $\delta$ -lactam und als Negativkontrolle wurde kein Substrat zugesetzt.

Bei der Analyse des Reaktionsverlaufs von Glutamyl-*p*-anilid zu Glutamat und *p*-Nitroanilin (ohne Akzeptor) erfolgte ein Anstieg der Absorption auf 0,067 innerhalb von zwei Stunden. Danach stagnierte dieser Wert und nach sechs Stunden Reaktionszeit war die Absorption auf 0,057 gesunken. Wenn als Glutamylakzeptor Ornithin verwendet wurde, stieg die Absorption innerhalb von zwei Stunden auf 0,054 und ging nach sechs Stunden auf 0,05 zurück. Bei Ornithin- $\delta$ -lactam nahm die Absorption auf 0,071 zu und reduzierte sich nach sechs Stunden auf 0,059. Die Absorption erreichte bei Glycylglycine innerhalb von zwei Stunden einen Wert von 0,055 und sank nach sechs Stunden auf 0,050 (Abbildung 69). Somit zeigte keiner der hier verwendeten Glutamylakzeptoren einen signifikant unterschiedlichen Reaktionsverlauf zu der Negativkontrolle (ohne Akzeptor). Der Akzeptor wurde im vierfachen Überschuss zu Glutamyl-*p*-nitroanilid

eingesetzt. Daher war durch den Akzeptor kein limitierender Effekt zu erwarten. Mit dem  $\epsilon_{p\text{-Nitroanilid}}$  von  $8,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  lag die Konzentration von freiem *p*-Nitroanilid bei der Reaktion mit Ornithin- $\delta$ -lactam bei  $0,008 \text{ mM}$ . Das entspricht einem Umsatz von  $0,16 \%$ . Das Enzym PPA\_G1318746 aus *P. pallidum* war also nicht in der Lage, Ornithin oder Ornithin- $\delta$ -lactam unter den hier verwendeten Reaktionsbedingungen an das  $\gamma$ -Carbonylkohlenstoffatom des Glutamats zu binden und somit eine mögliche Vorstufen des Glorins zu bilden. Auch das Dipeptid Glycylglycin konnte nicht an die Seitenkette des Glutamats gebunden werden.

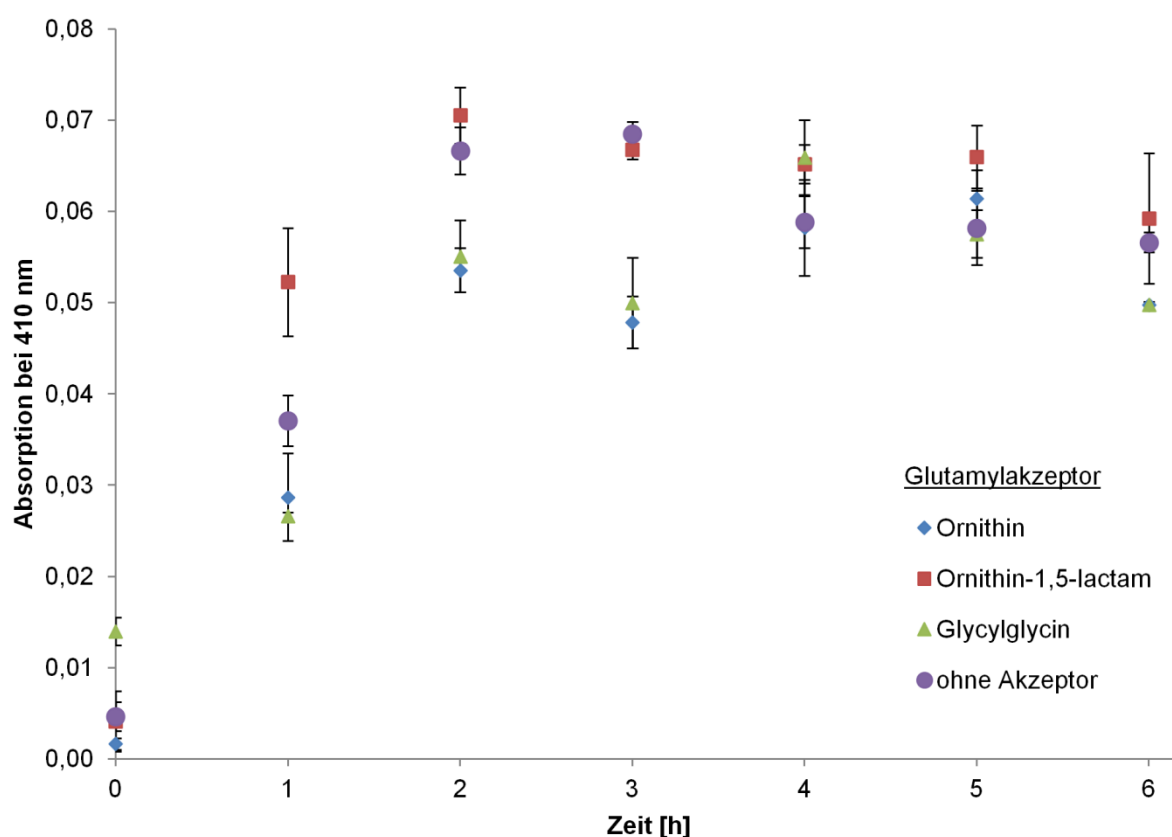


Abbildung 69: Absorptionsverlauf der durch die  $\gamma$ GT katalysierten Reaktion von Glutamyl-*p*-nitroanilid mit Ornithin (blau), Ornithinlactam (rot), Glycylglycin (grün) oder ohne Akzeptor (lila). Gemessen wurde die Absorption des freien *p*-Nitroanilins bei 410 nm. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung eines Experiments, welches als jeweilige Dreifachbestimmung parallel durchgeführt wurde.

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung eines Glorinase-Assays

Es konnte erfolgreich ein neuer HPLC-basierter biochemischer Assay, der Glorinase-Assay, etabliert werden. Der Glorinase-Assay bestimmt die enzymatische Aktivität, die in Überständen von sekretierten Proteinen oder in Zellsuspensionen von membran-gebundenen Proteinen das Signalmolekül Glorin degradiert. Amöben werden bei Anzucht auf Bakterien standardmäßig auf SM-Agar-Platten bei pH-Werten von 6-6,5 kultiviert [92]. Um glorinaseangereicherte Überstände und Zellen zu erhalten, wurde deshalb für 17 mM Phosphatpuffer ein Standard-pH-Wert von 6,2 gewählt. Die Enzymaktivität wurde durch Inkubation für 10 min bei 95 °C inaktiviert. Alternativ zu dieser Methode hätte die Enzymreaktion durch starke Absenkung des pH-Wertes, z.B. durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure, gestoppt werden können. Mit einer Standardkonzentration von 300 µM Glorin konnten gut auswertbare Glorinaseassays durchgeführt werden.

Der HPLC-basierte Glorinase-Assay ist einfach durchzuführen, aber nicht ohne weiteres für eine größere Anzahl von Proben geeignet. Für eine größere Anzahl könnte ein photometrischer Assay entwickelt werden. Dieser hätte mindestens drei Vorteile: 1. Es wäre keine weitere Probenvorbereitung wie bei einer HPLC nötig, 2. das Ergebnis wäre in Echtzeit verfügbar und 3. ließe sich mit 96-Well-Platten eine Hochdurchsatz-Variante etablieren. Eine Möglichkeit für einen solchen photometrischen Assay wäre die Entwicklung eines *p*-Nitrophenolderivates von Glorin. *p*-Nitrophenol könnte anstelle des Ethanol mit der freien Carboxylgruppe verestert werden. Die Glorinase würde gegebenenfalls wie bei Glorin die Esterbindung spalten und es entstünde freies *p*-Nitrophenol. *p*-Nitrophenol besitzt ein Absorptionsmaximum bei 400 nm und die Reaktion könnte bei dieser Wellenlänge in Echtzeit beobachtet werden (Abbildung 70) [93]. *p*-Nitrophenol ist deutlich größer als Ethanol, deswegen könnte es sein, dass die Glorinase *p*-Nitrophenolglorin nicht umsetzt. Dann wäre der Glorinase-Assay so nicht möglich. Das Prinzip des photometrischen Assays mit einem *p*-Nitrobenzenderivat wurde schon mehrmals erfolgreich angewendet [77, 94, 95].

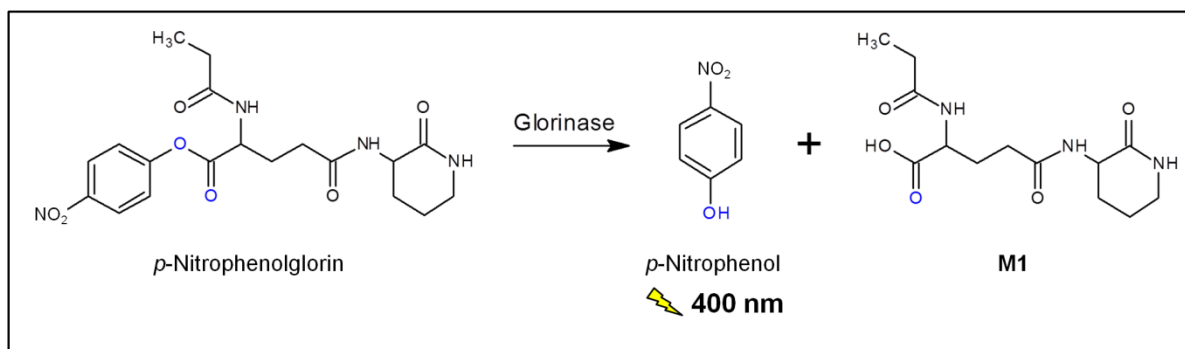


Abbildung 70: Reaktionsgleichung des möglichen photometrischen Glorinase-Assay

## 4.2 Identifizierung und biologische Aktivität des Glorinmetaboliten

Hochauflösende Massenspektrometrie identifizierte die Metaboliten **M1** als ethanolabgespaltenen Metaboliten von Glorin und **M2** als propionsäureabgespaltenen Metaboliten von **M1**. Die Daten zu den identifizierten Metaboliten **M1** und **M2** stehen in Konflikt zu denen, die zuvor von De Wit et al. publiziert wurden [48]. De Wit et al. postulierten als dominante enzymatische Aktivität die hydrolytische Öffnung des Lactamringes im Ornithin. Daraus entstünde Metabolit **M3** und als zusätzliche Nebenaktivität die hydrolytische Abspaltung der Propionsäure. Dem wiederum entspringe **M4** (Abbildung 71) [48].

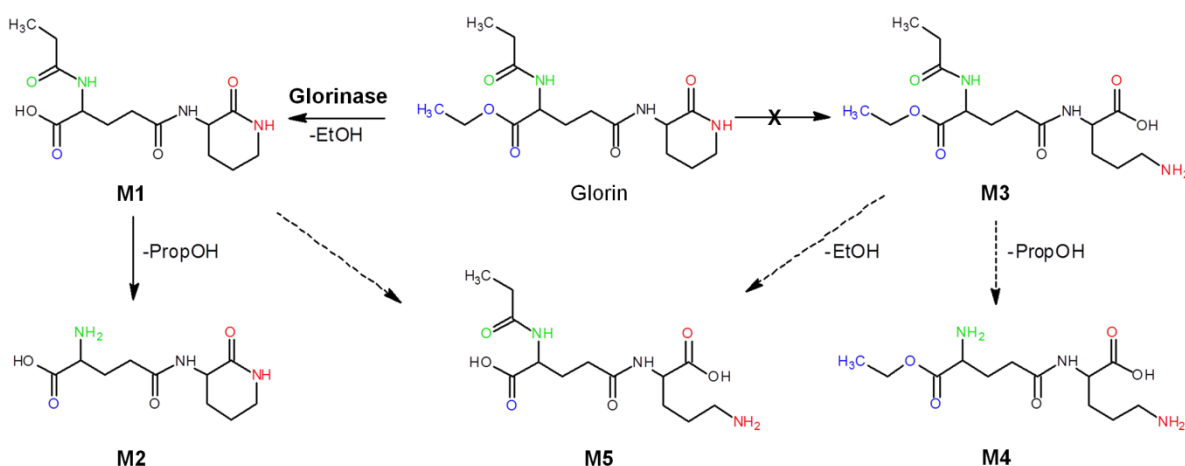


Abbildung 71: Glorin und dessen mögliche Metaboliten durch Hydrolyse. Durchgezogene Pfeile führen zu Metaboliten, die in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten. (Kopie von Abbildung 32)

Zusätzliche Tests bestätigten die Struktur von **M1**. De Wit et al. untersuchten die Glorindegradation von *P. violaceum* [48], aber die Vermutung, dass *P. violaceum* eine andere Degradation von Glorin durchführt als *P. pallidum*, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Glorin wurde durch *P. violaceum* zu **M1** degradiert (Abbildung 33). De Wit et al. führten ihre Experimente unter ähnlichen Reaktionsbedingungen (Phosphatpuffer, pH 6,0–6,2) wie hier beschrieben durch, sodass sich vermuten lässt, dass De Wit et al. die Elutionsprofile der Ionenaustauschchromatographie falsch interpretiert haben. Des Weiteren standen De Wit et al. möglicherweise noch keine LC-MS zur Verfügung, um die genauen Massen der Metaboliten zu bestimmen.

Glorin besitzt mindestens zwei biologische Aktivitäten als Signalmolekül: 1. In *P. pallidum* wird die Expression von mehreren Genen durch Glorinpulse verstärkt, 2. Gloringradienten vermitteln Chemotaxis in Richtung der höheren Glorinkonzentration [46].

**M1** besaß keine glorinähnliche Aktivität bezüglich der zwei glorininduzierten Markergene. Die chemotaktische Aktivität von Glorin und **M1** bei *P. pallidum* wurde mit der Insall-Chamber bestimmt. Es konnte das erste Mal direkt gezeigt werden, dass sich die Zellen in einem 0-100 nM Gloringradienten gerichtet in die Richtung der höheren Glorinkonzentration bewegen (Abbildung 26). Wenn *P. pallidum* einem Gradienten von **M1** ausgesetzt wurde, ließ sich nur eine zufällige Zellmigration beobachten. **M1** besitzt laut den hier gezeigten Ergebnissen keine glorinähnliche biologische Eigenschaft und durch den enzymatischen Abbau von Glorin zu **M1** entsteht ein selbstgenerierter Gloringradient, der die Chemotaxis in Richtung der höheren Konzentration forciert [39]. Somit ist das Enzym, welches den Abbau von Glorin zu **M1** katalysiert, die Glorinase. Dies ist der erste direkte Beweis, dass *P. pallidum* eine aktive Glorinase sekretiert. Die weitere Hydrolyse von **M1** zu **M2** ist physiologisch für die Aggregation nicht wichtig. Es könnte sein, dass **M2** eine Funktion besitzt, die in der späteren Entwicklung von *P. pallidum* benötigt wird, z.B. für die Induktion von Genen für spätere Entwicklungsphasen. Möglich wäre aber auch, dass dieser enzymatische Abbau durch eine unspezifische Hydrolase zustande kommt und physiologisch bei geringerer Glorinkonzentration nicht beobachtet werden kann.

### 4.3 Glorinaseaktivität in hungernden und vegetativen Zellen

Die Glorinaseaktivität konnte in hungernden *P. pallidum* zellgebunden und sekretiert im umgebenden Medium detektiert werden (Abbildung 14).

Die sekretierte Glorinaseaktivität stagnierte nach vier Stunden auf dem höchsten Aktivitätsniveau. Die zellgebundene Glorinaseaktivität zeigte nach einer Stunde Entwicklung eine Peakaktivität und nahm dann deutlich ab. Die Stagnation der Glorinaseaktivität könnte durch den Stopp der Glorinasesekretion zustande kommen. In diesem Fall unterliegt die Glorinase keinem direkten Enzymabbau. Es könnte aber auch sein, dass der Abbau und die Sekretion der Glorinase sich im Gleichgewicht befanden. Die Peakaktivität der zellgebundenen Glorinase wurde auch von De Wit et al. in *P. violaceum* beobachtet [48]. Diese Daten zeigen, dass die Expression des glorinasecodierenden Gens während der Entwicklung reguliert wird.

In *D. discoideum* wird die Expression der Gene des Acrasinsystems zu Beginn der Entwicklungsphase mindestens fünffach verstärkt gebildet, um die Kompetenz für die interzelluläre Kommunikation auszubilden [96, 97]. In *P. violaceum* konnten De Wit et al. zeigen, dass 78 % (35 000 Rezeptoren pro Zelle) der maximalen Anzahl des Glorinaserezeptors bereits in vegetativen Zellen vorhanden sind und es nur zu einer Steigerung um 22 % auf 45 000 während der Aggregation kommt [48]. Ob die Glorinaseaktivität in vegetativen Zellen von *P. pallidum* schon zellgebunden vorhanden war, ließ sich nicht eindeutig ermitteln. Frisch geerntete Zellen ohne Waschschrift konnten Glorin langsam abbauen und diese Aktivität verdreifachte sich innerhalb der ersten Stunde nach der Ernte (Abbildung 15). Es kann nun sein, dass Glorinase bereits in vegetativen Zellen vorhanden ist. Möglich wäre aber auch, dass sich einige Zellen (die Gründerzellen) auf der Kulturplatte schon im Entwicklungszyklus befanden und so vermehrt Glorinase gebildet hatten. Asghar konnte zeigen, dass *P. pallidum*-Zellen auch ohne vorherige Hungerphase bei einem Glorinpuls bereits nach fünf Minuten die Expression glorininduzierter Gene hochregulierten. Das deutet darauf hin, dass der Glorinrezeptor in vegetativen Zellen latent vorhanden ist [51]. Wenn Komponenten der glorinbasierten Zell-Zell-Kommunikation identifiziert wurden, lässt sich mit RT-qPCR spezifisch die Genregulation der ermittelten Komponenten in vegetativen und hungernden Zellen vergleichen. Mit diesem Ergebnis wären genauere Aussagen über die Regulierung des Glorinsystems während des Wachstums und in der Entwicklung möglich.



#### 4.4 Suche nach einem Inhibitor der Glorinase und des sekretierten Glorins

Es konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt, außer in *P. violaceum* [45], für keinen auf Glorin reagierenden Organismus die Glorinsekretion nachgewiesen werden. Die Methode von Shimomura et al., mit der Glorin erstmals isoliert wurde, ist sehr zeit- und kostenaufwendig, da eine riesige Anzahl an Platten nötig ist, um genügend Amöben zu kultivieren, die ausreichend Acrasin produzieren [45]. Um sekretiertes Glorin im umgebenden Medium durch hungrige Zellen anzureichern, sollte ein geeigneter Glorinaseinhibitor gefunden werden.

Keine der in dieser Arbeit getesteten Verbindungen wies eine potente Inhibierung der Glorinase auf. Trotz der strukturell konservierten  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung von Proteasen und Carboxylesterasen und des ähnlichen Reaktionsmechanismus der Hydrolyse (katalytische Triade) [79] konnte kein Proteaseinhibitor die Glorinase inhibieren. Die nicht vorhandene Inhibition der Glorinase durch Proteaseinhibitoren kann man mit dem unterschiedlichen Substratspektrum und der unterschiedlich katalysierten Reaktion erklären. Die Substrate von Proteasen sind Proteine oder Polypeptide und es wird eine Peptidbindung gespalten. Das Substrat der Glorinase ist ein Dipeptid und es wird eine Esterbindung gespalten. Bei Zusatz von EDTA stieg der Glorinumsatz um 17 %. EDTA ist ein Komplexbildner, komplexiert zweiwertige Kationen und kann so Metalloproteasen und andere Enzyme, die zweiwertige Metallionen als Cofaktoren benötigen, hemmen. Im Glorinase-Assay werden keine Cofaktoren zugesetzt und im Phosphatpuffer sind nur die einwertigen Metallionen Kalium und Natrium enthalten. Deshalb ließe sich vermuten, dass ein möglicher Inhibitor der Glorinase, der mit der Glorinase zusammen von *P. pallidum* sekretiert wurde, durch EDTA gehemmt wird und so eine höhere Glorinaseaktivität gemessen werden konnte.

Die Inhibition der  $\delta$ -Ornithinlactamanaloga und Glorinamid beruht auf kompetitiver Inhibition. 2-Aminocyclohexanon und Glorinamid zeigten die stärkste Inhibition der Glorinase mit der Reduktion des Glorinumsatzes um 44,2 % bzw. 54,1 % bei zehnfachem Überschuss zum Glorin. Dies sind aber dennoch schwache Hemmungen der Glorinase und diese Verbindungen können nicht zur Anreicherung von sekretiertem Glorin genutzt werden. Mit einem deutlich größeren Überschuss von Glorinamid ließe sich eine stärkere Hemmung der Glorinase beobachten. Bei höheren Glorinamidkonzentrationen kommt es aber zu Löslichkeitsproblemen von Glorinamid, die wiederum mit mehr DMSO

behooben werden müssten. Die geringe Hemmung der Glorinase durch Ornithinlactamanaloga könnte man mit einer geringeren Affinität der Verbindungen zum aktiven Zentrum im Vergleich zu Glorin erklären, da wahrscheinlich noch andere Teile vom Glorin an der Bindung im aktiven Zentrum beteiligt sind. Bei Glorinamid hätte man eine stärkere Hemmung der Glorinase vermutet, da bis auf das Amid anstatt eines Esters die Moleküle identisch sind. Des Weiteren wurde Glorinamid als Agonist des Glorinrezeptors identifiziert und somit hat die Amidbindung keine Auswirkung auf die Bindung am Glorinrezeptor. Trotz der Rezeptorbindung von Glorinamid könnte man vermuten, dass Glorinamid von der Glorinase nicht gebunden wird und deshalb auch kein Abbau von Glorinamid detektiert wurde. In diesem Fall müsste man aber eine deutlich geringere Inhibition der Glorinase beobachten. Es könnte auch sein, dass die Glorinase eine sehr hohe Substratspezifität besitzt und so jede kleine Änderung im Molekül gleichzeitig zu einer deutlich geringeren Affinität im aktiven Zentrum führt.

Zou et al. zeigten viele Inhibitoren für die humanen Carboxylesterasen CES1 und CES2 auf [98]. Einige der dort aufgeführten Inhibitoren könnten auf ihre Eigenschaft, die Glorinase zu inhibieren, getestet werden, aber die Enzyme CES1 und CES2 besitzen eine hohe Promiskuität [99]. Die Glorinase ihrerseits degradiert ein Signalmolekül und wird, wie oben bereits erwähnt, eine hohe Substratspezifität besitzen. Deswegen werden die meisten Inhibitoren der CES1 und CES2 keine Inhibitoren der Glorinase sein.

Für eine Glorinanreicherung könnte auch versucht werden, dass Glorin direkt nach der Sekretion durch Festphasenextraktionskügelchen zu immobilisieren und so vor dem Abbau zu schützen. Dafür würde eine Kultur mit sozialen Amöben bakterienfrei gewaschen und dann in 17 mM Phosphatpuffer resuspendiert werden. Dieser Zellsuspension ist direkt z.B. C18-Festphasenmaterial in Kugelform zuzugeben, um sie dann bei 22 °C und 100 rpm zu inkubieren. Das Festphasenmaterial könnte auch in einer Dialysemembran hinzugegeben werden, durch die die Proteine nicht und niedermolekulare Verbindungen, wie z.B. Glorin, hindurch diffundieren können. So wäre immobilisiertes Glorin auch räumlich von der Glorinase getrennt, was die Stabilität von Glorin zusätzlich erhöhen sollte. Nach der Entnahme des Festphasenmaterials lässt sich Glorin davon lösen und mit einer HPLC detektieren.

#### 4.5 Das Sekretom, aktivitätsgeleitete Fraktionierung und Proteomics

Das Sekretom von *Polysphondylium pallidum* wurde mittels MALDI-TOF untersucht. Es konnten ein Von-Willebrand-Faktor-Domäne enthaltendes Protein, ein Lipoprotein und eine Aminooxidase identifiziert werden. Als Hydrolasen wurden Cathepsin D, Chitinase und Cysteinproteinase nachgewiesen (Abbildung 34 und Tabelle 8). Diese gehören aber nicht zu den Carboxylesterasen und können somit nicht die gesuchte Glorinase sein. Da durch die Analyse des Sekretoms kein Glorinasekandidat ermittelt wurde, wurde das Sekretom durch verschiedene Methoden aktivitätsgeleitet fraktioniert. Damit sollte die proteomische Analyse auf eine geringe Anzahl von Banden fokussiert werden.

Die Fraktionierung mittels Lektin Concanavalin A aus der Jackbohne trennt nicht-glykosylierte Proteine von glykosylierten Proteinen oder, anders gesagt, cytosolische Proteine von sekretierten Proteinen. Alle im Überstand enthaltenen Proteine wurden durch eine ConA-Säule gebunden und sind somit Glykoproteine. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Herstellung des glorinaseangereicherten Überstandes (Schüttelkultur vier Stunden bei 22 °C und 100 rpm, Ernte bei 300 g) nicht zur Lyse der Zellen und somit zur Anreicherung von cytosolischen Proteinen führt. Aber auch mit einem Stufengradienten von 0, 100, 350 und 500 mM Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid wurden die Proteine nicht fraktioniert (Abbildung 35 bis Abbildung 38). Deswegen eignet sich diese Methode, um die sekretierten Proteine zu konzentrieren und, wenn vorhanden, von cytosolischen Proteinen zu trennen, aber nicht zur Fraktionierung des Sekretoms von *P. pallidum*.

Die Fraktionierung der Glorinaseaktivität mittels Ultrafiltration zeigte eine aktive Glorinase bei ca. 100 kDa. Doch die Fraktionierung des Sekretoms mit der Größenausschlusschromatographie ergab eine weite Streuung der aktiven Glorinase von >600-200 kDa. Das anschließende SDS-Gel verstärkte die Annahme, dass die aktive Glorinase ein Oligomer sein könnte. Bei der aktiven Glorinase könnte es sich um verschieden große Homo- oder Heterooligomere (Multiproteinkomplex) handeln. Aufgrund der großen Aktivitätsstreuung ist die Größenausschlusschromatographie nur als zweiter Reinigungsschritt von einer homogenen Glorinaselösung denkbar.

Die Fraktionierung des Sekretoms von *P. pallidum* mittels Anionenaustauschchromatographie zeigte die besten Resultate. Es gab einen Aktivitätspeak begrenzt auf einige Fraktionen bezüglich der Glorinaseaktivität und das Sekretom wurde gut durch den Salzgradienten aufgetrennt (Abbildung 45 und Abbildung 47).

Wie oben erwähnt, ist laut Ultrafiltration die aktive Glorinase ca. 100 kDa groß, laut Größenausschlusschromatographie eluiert die aktive Glorinase über 200 kDa. Diese Ergebnisse zusammen mit den Gelen der AAC sprechen für einen Monomer, wenn die Glorinase ca. 200 kDa groß ist, aber dann müsste es noch aktive Degradationsprodukte der Glorinase geben. Es könnte aber auch ein Homodimer oder Homotrimer sein, wenn die Glorinase in den Banden bei ca. 60, 40 und 35 kDa enthalten war, oder die aktive Glorinase ist ein heterogener Multiproteinkomplex aus verschiedenen Proteinen. In *D. discoideum* finden sich einige Beispiele für Multiproteinkomplexe. So werden in der Quorum-Sensing-Phase (ca. 5 h vor Entwicklungsstart) zwei Proteine CfaD und Arp in das Medium sekretiert, die einen 138 kDa-Komplex bilden, an die Zellen binden und die Proliferationsrate reduzieren [100]. Die Aktivität der sekretierten Phosphodiesterase PdsA wird durch ein Glykoprotein inhibiert. Bei hoher extrazellulärer cAMP-Konzentration liegt PdsA als Monomer vor und hat einen niedrigen  $K_M$  von 5  $\mu\text{M}$ . Bei niedriger cAMP-Konzentration bindet der Inhibitor an PdsA und der  $K_M$  erhöht sich auf 2 mM [101]. Interessant ist die Beobachtung, dass die einzige Bande bei ca. 60 kDa in Fraktion 5 der Größenausschlusschromatographie in der AAC eine Aktivitätskorrelation zeigte. Deshalb wurden diese Bande und noch einige andere weiter proteomisch analysiert (Abbildung 42 und Abbildung 45).

Es wurden verschiedene proteomische Methoden verwendet, um die Glorinase zu identifizieren. Das Sekretom wurde durch tryptischen Verdau von SDS-Gel-Banden und anschließender MALDI-TOF untersucht. Dies führte, wie oben bereits erwähnt, zu keinem Glorinasekandidaten. Nach der Fraktionierung mittels AAC wurden die aktivitätskorrelierenden Banden aus dem SDS-Gel tryptisch verdaut und anschließend mit MS untersucht. Dies ergab einen Glorinasekandidaten PPA\_G1385236. In einem anderen Ansatz wurde das Sekretom mittels AAC fraktioniert und die Fraktionen mit der höchsten Glorinaseaktivität wurden, ohne Auftrennung durch ein SDS-Gel, direkt tryptisch verdaut und mit LC-MS/MS untersucht. Die Fraktion mit der höchsten Aktivität ging bei der Untersuchung leider verloren, aber in den verbleibenden Fraktionen konnten auch hier der Glorinasekandidat PPA\_G1385236 und ein weiterer Glorinasekandidat PPA\_G1286130 identifiziert werden. Beim Vergleich der drei Methoden scheint durch die vorherige Auftrennung durch ein SDS-Gel die Findungsrate von Proteinen stark herabgesetzt zu sein. Aber im zweiten Ansatz wurde auch mehr Ausgangsmaterial eingesetzt, sodass sich die Identifikationswahrscheinlichkeit deutlich erhöht.

#### 4.6 Heterologe Expression von Genen die für sekretierte und cytosolische Proteine von *Polysphondylium pallidum* kodieren

Die identifizierten Glorinasekandidaten sollten als gereinigtes rekombinantes Enzym Glorin auch zu **M1** degradieren. Dies würde beweisen, dass die Glorinase von *P. pallidum* gefunden wurde. Es konnte keine aktive rekombinante Glorinase identifiziert werden.

Es wurden verschiedene Expressionswirte und -bedingungen getestet. Alle getesteten *E. coli*-Stämme lieferten nur unlösliche Glorinasekandidaten. Es lag die Vermutung nahe, dass die durch den Sequenzvergleich von PPA\_G1385236 mit der humanen Butyrylcholinesterase ermittelten zwei oder sogar drei Disulfidbrücken in PPA\_G1385236 im Cytosol von *E. coli* nicht korrekt gebildet wurden. Aber auch die Sekretion des Glorinasekandidaten in das Periplasma von *E. coli* lieferte kein lösliches rekombinantes Protein. Es könnte sein, dass die Disulfidbrücken trotz Sekretion ins Periplasma nicht richtig gebildet wurden oder dass das Fusionsprotein nicht ins Periplasma sekretiert wurde.

Die erfolgreiche Expression der  $\gamma$ -GT PPA\_G1318740 aus *P. pallidum* in *E. coli* BL21 (DE3) zeigte jedoch, dass Gene aus *P. pallidum* löslich in *E. coli* exprimiert werden können. Dieses Protein liegt in *P. pallidum* aber wahrscheinlich cytosolisch vor. Die Glorinase hingegen ist ein Glykoprotein, wird posttranslational modifiziert und ins umgebende Medium von *P. pallidum* sekretiert. Somit könnte man vermuten, dass die posttranslationalen Modifikationen essentiell für die lösliche Faltung von PPA\_G1385236 sind. Ist das der Fall, dann sind Expressionsstämme von *E. coli* nicht in der Lage, PPA\_G1385236 oder andere von *P. pallidum* sekretierte Proteine löslich zu produzieren, da *E. coli* keine posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierungen durchführen kann.

*D. discoideum* wurde schon mehrfach erfolgreich zur Herstellung von Glykoproteinen verwendet [85, 86]. Deshalb wurde die Expression des glorinasekandidatenkodierenden Gens in *D. discoideum* AX2 zusätzlich durchgeführt. Da *D. discoideum* auch zu den sozialen Amöben gehört, sollte das Protein korrekt prozessiert und glykosyliert ins Medium sekretiert werden, obwohl es innerhalb der sozialen Amöben qualitative und quantitative Unterschiede in der Glykosylierung gibt [102]. *D. discoideum* AX2 konnte PPA\_G1385236 löslich exprimieren und das rekombinante Protein konnte mittels AAC gereinigt werden. Der lösliche rekombinante Glorinasekandidat zeigte keine

Glorinaseaktivität im Glorinase-Assay. Feasley konnte zeigen, dass *D. discoideum* und *P. pallidum* unterschiedliche Zuckerreste in Glykoproteine einbauen [102]. Wenn die Art der Zuckerreste eine wichtige Rolle für die Aktivität der Glorinase spielen würde, ließe sich die fehlende Aktivität mit falschen Zuckerresten erklären. Es könnte auch sein, dass *D. discoideum* das Protein zwar löslich, aber dennoch nicht korrekt faltet. In diesem Fall ließe sich auch keine oder eine reduzierte Aktivität beobachten. Es könnte noch versucht werden, das Gen für den Glorinasekandidaten homolog in *P. pallidum* zu exprimieren. Hier ist aber das Problem, Kultivierungsbedingungen zu finden, bei denen *P. pallidum* keine endogene Glorinase produziert, sodass sich kein falsch positives Ergebnis einstellt. Diese Kultivierungsbedingungen zu ermitteln, ist im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht gelungen. Falls die aktive Glorinase, wie oben bereits erwähnt, ein Multiproteinkomplex wäre, könnte mit einer einzelnen Komponente davon auch kein Glorinumsatz detektiert werden. Es könnte aber auch sein, dass PPA\_G1385236 keine Glorinase ist.

Falls PPA\_G1385236 nur ein Teil der aktiven Glorinase ist, könnte versucht werden, dies mit reverser Genetik zu bestätigen. Ein Transformationsprotokoll und die Technik der homologen Rekombination zur Generierung von Knock-out-Mutanten wurde bei *P. pallidum* bereits erfolgreich angewendet [103]. Es ließe sich ein PPA\_G1385236-Knock-out von *P. pallidum* herstellen. Wenn PPA\_G1385236 ein essentieller Teil der Glorinase ist, könnte diese Mutante keine aktive Glorinase sekretieren und im Glorinase-Assay würde kein Glorin abgebaut werden. Des Weiteren müsste die Aggregation ausbleiben, da sekretiertes Glorin nicht abgebaut würde und so keine Chemotaxis möglich wäre. Mit *P. pallidum* wurden bereits REMI-Mutanten hergestellt [104]. Dies wäre eine weitere Möglichkeit, Gene, die für die Glorinase kodieren, zu identifizieren. In aggregationsdefizienten Mutanten werden die zerstörten Gene bestimmt.

## 4.7 Glorinbiosynthese

Ashma Asghar verwies in ihrer Dissertation auf die strukturelle Ähnlichkeit von Glorin und Glutathion. Sie stellte die Hypothese auf, dass Teile der Glutathionbiosynthese die Glorinbiosynthese durchführen. Sie postulierte, dass eine Vorstufe von Glorin aus Glutamat und Ornithinlactam durch eine  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase gebildet werden könnte [51]. Diese Annahme wurde überprüft. Dafür wurden mit einer  $\gamma$ -GT aus *E. coli* (P18956) die  $\gamma$ -GTs in *P. pallidum* und anderen sozialen Amöben identifiziert. Danach befinden sich in *P. pallidum* fünf paraloge  $\gamma$ -GTs und in *D. fasciculatum* eine  $\gamma$ -GT. Der Stammbaum der identifizierten  $\gamma$ -GT ergab, dass PPA\_G1318746 näher mit der  $\gamma$ -GT DFA\_1571190 aus *D. fasciculatum* verwandt ist als mit seinen vier Paralogen. Da *D. fasciculatum* Glorin degradieren kann (Abbildung 33) und somit wahrscheinlich Glorin als Signalmolekül nutzt und synthetisiert, wurde PPA\_G1318746 als möglicher Bestandteil in der Glorinbiosynthese näher untersucht. PPA\_G1318746 enthält keine Signalsequenz und liegt somit cytosolisch vor.

Die Expression des Gens von PPA\_G1318746 erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) (22 °C, 140 rpm, ca. 16 h). Das rekombinante Protein wurde unter diesen Standardbedingungen löslich produziert. Die  $\gamma$ -GT unterliegt nach der Proteinsynthese einem autokatalytischen Prozess, der zur aktiven  $\gamma$ -GT führt [105]. Auch diese autokatalytische Prozessierung konnte während der Expression und des Zellaufschlusses beobachtet werden (Abbildung 66). Die beiden gebildeten Untereinheiten waren stark aggregiert und ließen sich mit einer einstufigen Reinigung gemeinsam reinigen (Abbildung 67). Somit lag die rekombinante  $\gamma$ -GT PPA\_G1318746 gereinigt, löslich und korrekt prozessiert vor und konnte für den Aktivitätstest verwendet werden.

Der Aktivitätstest war bei keinem eingesetzten Glutamatakzeptor erfolgreich. Es konnte nur eine sehr schwache Hydrolyse von Glutamyl-*p*-nitroanilid von weniger als 0,16 % beobachtet werden (Abbildung 69). Die Glutamatakzeptoren lagen im vierfachen Überschuss zu Glutamyl-*p*-nitroanilid vor. Deswegen sollte die Konzentration der Glutamatakzeptoren kein limitierender Faktor gewesen sein. Der Aktivitätstest entsprach bis auf den pH-Wert, der bei 7 statt bei 8 lag, dem von Orlowski und Meister [77]. Der Assay wurde von Nicole Duckwitz auch bei einem pH-Wert von 8,5 mit Glycylglycin als Akzeptor durchgeführt. Bei diesem pH-Wert konnte aber ebenfalls keine Transpeptidaseaktivität beobachtet werden [88]. Die schlechte Löslichkeit von

Glutamyl-*p*-nitroanilid ist erst bei dem pH-Wert von 6,0 zu beobachten [106]. Die Assaybedingungen sollten also eine Transpeptidasereaktion ermöglichen. Wie oben schon erwähnt, ist PPA\_G1318746 am nächsten mit dem einzigen Ortholog in *D. fasciculatum* verwandt, welcher auch Glorin als Signalmolekül nutzt. Es könnte aber sein, dass einer der anderen vier Paraloge zu PPA\_G1318746 in der Glorinbiosynthese beteiligt ist. Glutamyl-*p*-nitroanilid ist kein physiologisches Substrat für eine  $\gamma$ -GT und nach der ersten Regel der Gerichteten Evolution von industriell relevanten Enzymen „You get what you screen for“ wäre es möglich, dass PPA\_G1318746 eine hohe Substratspezifität besitzt und nur die physiologisch richtigen Vorstufen umsetzt [107]. Wenn dies der Fall ist, kann der elegante photometrische Aktivitätsassay nicht verwendet werden, um die hier gemachte Annahme zu überprüfen. Dann müsste ein HPLC-basierter Assay entwickelt werden, um nach den physiologischen Substraten zu suchen. Der Test könnte mit freiem Glutamat oder Glutathion als Donor und Ornithin oder Ornithin- $\delta$ -lactam als Akzeptor beginnen. Wenn dies nicht funktioniert, könnte Glutamat blockiert mit Ethanol und Propionsäure als Substrat verwendet werden. In Verbindung mit Ornithin- $\delta$ -lactam wäre bereits Glorin synthetisiert. Die Annahme, dass die Glorinbiosynthese im GSH-Zyklus stattfindet, könnte aber auch falsch sein.

#### 4.8 Der Glutathionzyklus in den sozialen Amöben?

Die Suche nach einer geeigneten  $\gamma$ -GT aus *P. pallidum* für die mögliche Biosynthese von Glorin zeigte einen nicht vorherzusehenden Unterschied unter den sozialen Amöben. In *P. pallidum* (Gruppe 2B) wurden fünf mögliche  $\gamma$ -GTs identifiziert. Dagegen zeigte sich in *D. fasciculatum* (Gruppe 1), *A. subglobosum* (Gruppe 2A) und *D. lacteum* (Gruppe 3) nur eine  $\gamma$ -GT. Aber das kuriose Ergebnis ist, dass *D. discoideum* (Gruppe 4) und anscheinend auch *P. violaceum* keine  $\gamma$ -GT besitzen. Jetzt stellt sich die Frage, warum manche sozialen Amöben ohne  $\gamma$ -GT auskommen.

Über den Glutathionstoffwechsel in den sozialen Amöben ist wenig bekannt. Kim et al. konnten das Gen *gcsA* für eine Glutamyl-Cystein-Synthetase in *D. discoideum* identifizieren [108]. Sie konnten zeigen, dass Glutathion essentiell für das Wachstum und die Entwicklung von *D. discoideum* ist [108]. Kim et al. postulierten, dass GSH die Expression der Proteinkinase YakA induziert, wodurch CAR1 und ACA hochreguliert werden [109]. Durch eine Blastp-Analyse konnte jeweils mindestens ein Ortholog der



Glutamyl-Cystein-Synthetase in *D. purpureum*, *D. polycephalum*, *P. pallidum*, *D. fasciculatum*, *D. lacteum* und *A. subglobosum* identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Lee et al. konnten eine Glutathion-Synthetase identifizieren und nochmals bestätigen, dass Glutathion essentiell für die Entwicklung von *D. discoideum* ist [110]. Durch eine Blastp-Analyse konnte jeweils ein Ortholog der Glutathion-Synthetase in *D. purpureum*, *D. lacteum*, *D. fasciculatum*, *A. subglobosum* und *P. pallidum* identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Somit lässt sich vermuten, dass Spezies in allen Gruppen der sozialen Amöben zur Biosynthese von Glutathion in der Lage sind. Durch eine Blastp-Analyse mit dem Referenzprotein Cys-Gly-Metallodipeptidase DUG1 aus *S. cerevisiae* (UniProt P43616) konnte jeweils mindestens ein Ortholog in *D. discoideum*, *D. fasciculatum*, *A. subglobosum*, *D. purpureum*, *D. lacteum* und *P. pallidum* identifiziert werden. Hier wurde als mögliche spezifische Enzymfunktion eine Succinyl-Diaminopimelatdesuccinylase vorgeschlagen (Daten nicht gezeigt). Mit der membranständigen Alanin-Amino-peptidase aus dem Tabakknospenswurm (UniProt Q11000) als Referenzprotein wurde auch jeweils ein Ortholog in Spezies der Gruppen 1-4 erfasst. Es lässt sich vermuten, dass der Glutamylyklus in Spezies der Gruppen 1, 2 und 3 wie von Lieberman et al. beschrieben abläuft [87]. Ob Glutathion einen essentiellen Einfluss auf das Wachstum oder die Entwicklung der Spezies 1, 2 und 3 hat, kann hier nicht bestimmt werden. Das Fehlen einer  $\gamma$ -GT in *D. discoideum* ließe sich als weiteres Alleinstellungsmerkmal der Gruppe-4-Spezies interpretieren. Es könnte ein Zusammenhang zwischen cAMP als Acrasin und der Deletion von der  $\gamma$ -GT vermutet werden (Etablierung eines neuen Signalmoleküls). Denn die GSH-Konzentration hat einen direkten Einfluss auf die cAMP-basierte Aggregation [108-110]. Es wäre sehr interessant, die Funktion der fünf  $\gamma$ -GT in *P. pallidum* herauszufinden. Dies ließe sich durch Herstellung einzelner Knock-out-Mutanten erreichen. Falls die Mutanten einen unterschiedlichen Phänotyp zum Wildtyp in der Entwicklung zeigen, übernimmt die jeweils deletierte  $\gamma$ -GT eine Funktion in der Entwicklung.

#### 4.9 Glorinbasierte versus cAMP-basierte Zell-Zell-Kommunikation

Die sozialen Amöben sind eine monophyletische Gruppe, deren Evolution mindestens 600 Millionen Jahre zurückreicht [15]. De Wit et al. konnten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen glorin- und cAMP-basierter Aggregation feststellen. So bilden beide Systeme ein acrasinabbauendes Enzym zellgebunden und sekretiert, Rezeptoren für die Acrasine sind auf der Zelloberfläche vorhanden, die Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt. Das Acrasin ruft mehrere zelluläre Reaktionen wie z.B. Chemotaxis und die Akkumulation von cGMP hervor. Die Acrasinwirkung ist während der Aggregation am größten und verschwindet in der späteren Entwicklung. Als Unterschied listeten De Wit et al. eine fehlende glorininduzierte Glorinsekretion auf, aber sie konnten eine Oszillation von 2,8 min in Populationen von *P. violaceum* sehen [48]. Die Dictyosteliden allgemein verwenden cAMP als Signalmolekül in der späten Entwicklung nach der Aggregation [21]. Als Signalmolekül für die Aggregation wird cAMP nur von Spezies aus der Gruppe 4 genutzt [41]. In dieser Arbeit konnte das erste Mal gezeigt werden, dass von Spezies der Gruppen 1-3 eine Glorinase sekretiert wird, die Glorin zu **M1** degradiert (Abbildung 33 und Anhang). Asghar et al. fanden heraus, dass Vertreter der Gruppen 1 und 2 in Chemotaxis-Assays auf Glorin reagieren [46]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Spezies Glorin als Signalmolekül, welches die Aggregation vermittelt, verwenden. Es ließe sich vermuten, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der sozialen Amöben eine glorinbasierte Signalvermittlung in der Aggregation benutzt hat [41, 51]. Das cAMP-System müsste danach nur in der Gruppe 4 für die Aggregation angepasst werden. Tatsächlich wurde das bestehende cAMP-System durch die Einführung eines zweiten Promoters distal der entsprechenden Gene, der die Regulation der Gene in der Aggregationsphase steuert, für die Aggregation genutzt [21, 111, 112]. Falls der letzte gemeinsame Vorfahre der sozialen Amöben das cAMP-System für die Aggregation bereits genutzt hat, hätte dieses mehrmals in der Evolution der Dictyosteliden durch andere Systeme ersetzt werden müssen. Dies ist weit aufwändiger, als ein bestehendes System einmal an eine neue Funktion anzupassen. Somit ist es, wie oben erwähnt, wahrscheinlicher, dass Glorin das erste Signalmolekül war, welches die Aggregation des letzten gemeinsamen Vorfahren der Dictyosteliden vermittelte.

#### **4.10 Ursprung der glorinbasierten Aggregation im letzten gemeinsamen Vorfahren der sozialen Amöben**

Die Entwicklung des multizellulären Zyklus der sozialen Amöben hat diesen einen ökologischen Vorteil verschafft. So können die Dictyosteliden einen Nahrungsmangel überstehen und ihre unzähligen Sporen weiter verteilen. An erster Stellen der Multizellularität steht die Aggregation von unzähligen Einzelzellen. Man kann die Frage stellen, wie diese aggregative Entwicklung in den letzten gemeinsamen Vorfahren der Dictyosteliden entstanden ist.

Wie oben bereits erwähnt, ist es am wahrscheinlichsten, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der Dictyosteliden das glorinbasierte System zur Aggregation nutzte. Asghar et al. stellten die Hypothese auf, dass es von einem ursprünglichen Quorum-sensing-System auf ein Acrasinsystem adaptiert wurde. Alternativ schlugen sie vor, dass Glorin ursprünglich von Bakterien sekretiert wurde, worauf die Amöben chemotaktisch reagieren, um die Bakterien zu phagozytieren, und dieses System zu einem Acrasinsystem angepasst wurde [46]. Der erste Fall würde erklären, welche Funktion das Aggregationssystem vorher hatte. Das bedeutet, die Komponenten des Aggregationssystems, wie Signalmolekül, Rezeptor und abbauendes Enzym, wären bereits vorhanden, würden aber nur z.B. zur Messung der Zelldichte genutzt. Später würde dieses System dann um die Chemotaxis auf das Signalmolekül erweitert.

Die zweite Hypothese bedeutet, dass einige Gene des Acrasinsystems von Bakterien abstammen würden und durch horizontalen Gentransfer in das Genom der sozialen Amöben integriert würden. Es gibt einige Beispiele für horizontalen Gentransfer von Prokaryoten zu Eukaryoten. Das bekannteste Beispiel ist wahrscheinlich die Endosymbionten-Theorie [113-115]. Aber es gibt auch Hinweise, dass Gene von Nahrungsbakterien in das Genom der eukaryotischen Räuber aufgenommen wurden, und Doolittle entwickelte daraus den Slogan „You are what you eat“ [116]. Glöckner et al. konnten bereits zeigen, dass 20 % der Gene der essentiellen Proteine für die Entwicklung durch horizontalen Gentransfer in das Genom von *D. discoideum* integrierten und nicht durch Vererbung durch den einzelligen Vorfahren weitergegeben wurden [117]. Die „fremden Proteine“ sind meist extrazelluläre oder sekretierte Proteine [117]. Alsmark et al. identifizierten unterschiedlich horizontal transferierte Gene in *D. discoideum* und dem human pathogenen Verwandten *Entamoeba histolytica*

[118]. Demnach besaß *D. discoideum* proteinkodierende Gene für den Membrantransport, die Signaltransduktion, den Aufbau von sekundären Metaboliten und für den Abbau von Fremdstoffen, die in *E. histolytica* nicht gefunden werden können [118]. Alle diese Argumente unterstreichen die zweite Hypothese, den prokaryotischen Ursprung einiger Komponente für das glorinbasierte Acrasinsystem. Falls die Hypothese, dass die Glorinbiosynthese von Teilen des Glutathionzyklus erledigt wird zutreffen würde, könnte man weiter vermuten, dass das glorinbasierte Acrasinsystem seinen Ursprung in einer GSH-basierten Signalvermittlung ausgehend von Bakterien hat.

Es könnte sein, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der Dictyosteliden, der noch nicht zur multizellulären Entwicklung fähig ist, Bakterien aufgrund von sekretierten GSH findet und phagozytiert, also Chemotaxis basierend auf GSH bereits betreibt. Es könnte sein, dass dann der einzellige Vorfahre aus der prokaryotischen Nahrung neben anderen auch Gene für den GSH-Zyklus in sein Genom integrierte. Daraus könnte sich die Biosynthese von Glorin entwickelt haben. Wenn Glorin bereits ein Agonist des bereits vorhandenen GSH-Chemotaxis-Rezeptors wäre, wäre die glorinbasierte Chemotaxis möglich. Wenn dazu noch das abbauende Enzym an Glorin als Substrat angepasst würde und die Nahrungssuche auf die heutige Chemotaxis auf Folsäure umgestellt würde oder bereits möglich war, wäre der erste Schritt der fakultativen Multizellularität, die Aggregation, möglich.

Wenn Teile der glorinbasierten Kommunikation identifiziert worden sind, lässt sich relativ einfach eine der beiden Hypothesen ausschließen oder bestätigen. Bei beiden Hypothesen lag der Glorin- oder GSH-Rezeptor im einzelligen Vorfahren der sozialen Amöben bereits vor. Bei der Quorum-Sensing-Hypothese sollten die spezifischen Genbäume der anderen Bestandteile der Signalvermittlung und der Biosynthese des Glorins mit der Phylogenie der Amoebozoa übereinstimmen. Bei der horizontalen Gentransfer-Hypothese sollte es einen Konflikt zwischen den Genbäumen und der Phylogenie der Amoebozoa geben [115].

## 5 Zusammenfassung

Die Dictyosteliden sind eine monophyletische Gruppe innerhalb der Amoebozoa. Sie leben im Waldboden, ernähren sich von Bakterien und Pilzsporen und vermehren sich durch Zweiteilung. Bei Nahrungsmangel zeigt sich der einzigartige Entwicklungszyklus der Dictyosteliden: Die Amöben aggregieren, differenzieren sich und bilden einen multizellulären Fruchtkörper mit ausdauernden Sporen. Die Aggregation der Amöben wird durch Chemotaxis in Richtung der höheren Konzentration eines Signalmoleküls (Acrasin) erreicht. Das Acrasin wird durch eine Acrasinase abgebaut um den Konzentrationsgradient zu verstärken. Die Dictyosteliden werden phylogenetisch in vier Gruppen aufgeteilt. Die Gruppen 1 und 2 haben sich paraphyletisch zu den Gruppen 3 und 4 entwickelt. Im Laufe der Evolution der sozialen Amöben haben sich unterschiedliche Acrasine mit sehr diversen Strukturen etabliert. So werden neben cAMP auch Pterinderivate und Glorin als Signalmoleküle genutzt. Glorin (N-propionyl- $\gamma$ -L-glutamyl-L-ornithine- $\delta$ -lactamethylester) ist ein blockiertes Dipeptid aus Glutamat und Ornithin- $\delta$ -lactam und wurde als Acrasin von *Polysphondylium violaceum* identifiziert.

In dieser Arbeit wurde die glorinbasierte Zell-Zell-Kommunikation während der frühen Entwicklung von *Polysphondylium pallidum* untersucht. Vorherige Publikationen legten bereits nahe, dass Glorin das Acrasin für *P. pallidum* ist. Die Acrasinase für Glorin ist definitionsgemäß die Glorinase. Durch die Identifizierung der Glorinase in *P. pallidum* kann man die Evolution des glorinabhängigen Aggregationssystems innerhalb der Dictyosteliden studieren und genauer verstehen. In dieser Arbeit wurde ein neuer HPLC-basierter Glorinaseassay etabliert. Damit ließ sich die Glorinaseaktivität in zellfreien Überständen (sekretierte Proteine) und Zellsuspensionen (sekretierte und membrangebundene Proteine) von *P. pallidum* in Schüttelkultur bestimmen. Die zellgebundene Glorinaseaktivität stieg in der ersten Stunde der Entwicklung an und fiel danach wieder deutlich ab. Die sekretierte Glorinaseaktivität nahm in den ersten vier Stunden der Entwicklung zu und blieb dann bis mindestens zur achten Stunde in der Entwicklung auf diesem hohen Niveau. Der Metabolismus von Glorin erfolgt über die Hydrolyse des Ethylesters zu dem Metaboliten **M1**. **M1** wurde als inaktiver Metabolit von Glorin bestätigt, diese Enzymreaktion wird per Definition von der Glorinase katalysiert. Es ließ sich erstmals die Chemotaxis von *P. pallidum* in einem festen Gloringradienten zeigen. Des Weiteren konnten zum ersten Mal in Spezies der

phylogenetischen Gruppen 1-3 die Glorinase und der Metabolit **M1** nachgewiesen werden. Die Struktur von **M1** wurde in dieser Arbeit durch hochauflösende Massenspektrometrie und zusätzlich durch Coelution von synthetisch hergestelltem **M1** und enzymatisch erzeugtem **M1** auf einer C18-Säule bestätigt. Damit wurden Ergebnisse einer Publikation aus dem Jahr 1988, in der ein anderer Metabolismus von Glorin postuliert wurde, widerlegt. Synthetisch hergestelltes Glorinamid, in dem die durch Glorinase gespaltene Esterbindung durch ein Amid ersetzt wurde, konnte durch die Glorinase nicht zu **M1** oder einem anderen Metaboliten abgebaut werden. Glorinamid zeigte glorinähnliche genregulatorische Eigenschaften und erwies sich so als Glorinrezeptor-Agonist. Die aktive Glorinase ist ein Glykoprotein. Ultra- und Gelfiltration deuten auf einen 100-200 kDa großen Multiproteinkomplex für die aktive Glorinase hin. Ein Gen für einen Glorinasekandidaten konnte heterolog in *D. discoideum* AX2 löslich exprimiert werden. Der rekombinante Glorinasekandidat zeigte aber keinen Umsatz von Glorin zu **M1**.

## 6 Summary

The Dictyostelids are a monophyletic group within the Amoebozoa. They live in soil, prey bacteria and fungal spores. They grow by binary fission. In case of starvation they show a unique life cycle. The single Amoebas aggregate, differentiate and built a multi cellular fruiting body with dormant spores. The aggregation is done by chemotaxis to the highest concentration of a signalling molecule (acrasin). The acrasin is degraded by an acrasinase to sharpen the concentration gradient. The Dictyostelids are divided in four groups. Group 1 and 2 evolved paraphyletic to group 3 and 4. In the Evolution of the social amoebas different acrasins with diverse structures had established. Besides cAMP also pterin derivatives and glorin are used as signalling molecule. Glorin (N-propionyl- $\gamma$ -L-glutamyl-L-ornithine- $\delta$ -lactam ethyl ester) is a blocked dipeptide out of glutamate and ornithine- $\delta$ -lactam ethyl ester and was identified as acrasin of *Polysphondylium violaceum*.

In these work the glorin-based cell-cell-communication in the early development of *Polysphondylium pallidum* was studied. Previous publications suggested that glorin is the acrasin of *P. Pallidum*. By definition the acrasinase of glorin is the glorinase. If the glorinase of *P. pallidum* could be identified the evolution of the glorin-based aggregation system in Dictyostelid could be studied and understand more deeply. A new HPLC-base Glorinase-Assay was established. With this the glorinase activity could be determined in cell-free supernatants (secreted proteins) and cell suspension (secreted and membrane bound proteins) of *P. pallidum* in shaking culture. The cell bound glorinase activity increased in the first hour of development and decreased considerably after this. The secreted glorinase activity increased in the first four hours of development and stayed on this level till eight hours of development. The metabolism of glorin is by hydrolysis of the ethyl ester resulting in the metabolite **M1**. **M1** was proofed as inactive metabolite of glorin and this enzyme reaction is done by the glorinase. The chemotaxis of *P. pallidium* in a stable glorin gradient was shown for the first time. Also for the first time the glorinase and the metabolite **M1** was proved in phylogenetic species from group 1-3. The structure of **M1** was determined by high resolution mass spectrometry and additionally by coelution of synthetically produced **M1** and enzymatically produced **M1** on a C18-column. Thereby a publication from 1988, which postulated a different metabolism of glorin, was rebuted. Synthetically produced glorinamide, where the glorinase cleavable ester bond is replaced by an amide, was not degraded by the glorinase to **M1** or another metabolite. Glorinamide showed glorin-like gene regulatory

properties and hence is a glorin-receptor-agonist. The active glorinase is a glycoprotein. Ultra- and gel filtration indicated the active glorinase as a 100-200 kDa multi protein complex. A gene for a glorinase candidate could be heterologously expressed soluble in *D. discoideum* AX2. The recombinant glorinase candidate showed no conversion of glorin to **M1**.



## Literaturverzeichnis

1. Stout J. D. (1973) The Relationship between Protozoan Populations and Biological Activity in Soils. *Am Zool* 13(1): 193–201. doi: 10.1093/icb/13.1.193
2. Raper K. B. (1984) The Dictyostelids. Princeton legacy library
3. Adl S. M., Simpson A. G., Lane C. E., Lukeš J., Bass D., Bowser S. S., Brown M. W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath M., Lara E., Le Gall L., Lynn D. H., McManus H., Mitchell, Edward A D, Mozley-Stanridge S. E., Parfrey L. W., Pawlowski J., Rueckert S., Shadwick L., Shadwick L., Schoch C. L., Smirnov A., Spiegel F. W. (2012) The revised classification of eukaryotes. *The Journal of eukaryotic microbiology* 59(5): 429–493. doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x
4. Eichinger L, Rivero F (eds) (2013) Dictyostelium discoideum Protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ
5. Schilde C., Schaap P. (2013) The Amoebozoa. In: Eichinger L, Rivero F (eds) Dictyostelium discoideum Protocols, vol 983. Humana Press, Totowa, NJ, pp 1–15
6. Brefeld O. (1869) Dictyostelium mucoroides. Ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten. Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft Frankfurt(7): 85–107
7. Romeralo M., Escalante R., Baldauf S. L. (2012) Evolution and Diversity of Dictyostelid Social Amoebae. *Protist* 163(3): 327–343. doi: 10.1016/j.protis.2011.09.004
8. Baldauf S. L., Romeralo M., Fiz-Palacios O., Heidari N. (2018) A Deep Hidden Diversity of Dictyostelia. *Protist* 169(1): 64–78. doi: 10.1016/j.protis.2017.12.005
9. Raper K. B. (1956) Factors Affecting Growth and Differentiation in Simple Slime Molds. *Mycologia* 48(2): 169. doi: 10.2307/3755469
10. Swanson A. R., Spiegel F. W., Cavender J. C. (2002) Taxonomy, slime molds, and the questions we ask. *Mycologia* 94(6): 968–979
11. Schaap P., Winckler T., Nelson M., Alvarez-Curto E., Elgie B., Hagiwara H., Cavender J., Milano-Curto A., Rozen D. E., Dinger mann T., Mutzel R., Baldauf S. L. (2006) Molecular Phylogeny and Evolution of Morphology in the Social Amoebas. *Science* 314(5799): 661–663. doi: 10.1126/science.1130670
12. Sheikh S., Gloeckner G., Kuwayama H., Schaap P., Urushihara H., Baldauf S. L. (2015) Root of Dictyostelia based on 213 universal proteins. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 92: 53–62. doi: 10.1016/j.ympev.2015.05.017
13. Singh R., Schilde C., Schaap P. (2016) A core phylogeny of Dictyostelia inferred from genomes representative of the eight major and minor taxonomic divisions of the group. *BMC Evol Biol* 16(1): 227. doi: 10.1186/s12862-016-0825-7
14. Schilde C., Lawal H. M., Kin K., Shibano-Hayakawa I., Inouye K., Schaap P. (2019) A well supported multi gene phylogeny of 52 dictyostelia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 134: 66–73. doi: 10.1016/j.ympev.2019.01.017

15. Heidel A. J., Lawal H. M., Felder M., Schilde C., Helps N. R., Tunggal B., Rivero F., John U., Schleicher M., Eichinger L., Platzer M., Noegel A. A., Schaap P., Glöckner G. (2011) Phylogeny-wide analysis of social amoeba genomes highlights ancient origins for complex intercellular communication. *Genome research* 21(11): 1882–1891. doi: 10.1101/gr.121137.111
16. Budniak A. A., O'Day D. H. (2012) Microcysts: The Third Developmental Pathway of Social Amoebozoans. *Protist* 163(1): 2–14. doi: 10.1016/j.protis.2011.06.007
17. Lonski J. (1976) The effect of ammonia on fruiting body size and microcyst formation in the cellular slime molds. *Developmental Biology* 51(1): 158–165
18. North M. J., Cotter D. A. (1991) Regulation of cysteine proteinases during different pathways of differentiation in cellular slime molds. *Developmental genetics* 12(1-2): 154–162. doi: 10.1002/dvg.1020120124
19. Urushihara H., Muramoto T. (2006) Genes involved in Dictyostelium discoideum sexual reproduction. *European journal of cell biology* 85(9-10): 961–968. doi: 10.1016/j.ejcb.2006.05.012
20. Budniak A., O'Day D. H. (2011) Tyrosine phosphorylation of actin during microcyst formation and germination in Polysphondylium pallidum. *Protist* 162(3): 490–502. doi: 10.1016/j.protis.2010.11.004
21. Schaap P. (2016) Evolution of developmental signalling in Dictyostelid social amoebas. *Current Opinion in Genetics & Development* 39: 29–34. doi: 10.1016/j.gde.2016.05.014
22. Loomis W. F. (2014) Cell signaling during development of Dictyostelium. *Developmental Biology* 391(1): 1–16. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.04.001
23. Bonner J. T. (1947) Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold Dictyostelium discoideum. *The Journal of experimental zoology* 106(1): 1–26
24. Konijn T. M., Van De Meene, J. G., Bonner J. T., Barkley D. S. (1967) The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 58(3): 1152–1154. doi: 10.1073/pnas.58.3.1152
25. Kessin R. H. (2001) Dictyostelium. Evolution, cell biology, and the development of multicellularity. Developmental and cell biology series. Cambridge University Press, Cambridge, NY
26. Schaap P. (2011) Evolution of developmental cyclic adenosine monophosphate signaling in the Dictyostelia from an amoebozoan stress response. *Development, growth & differentiation* 53(4): 452–462. doi: 10.1111/j.1440-169X.2011.01263.x
27. Brown D, Strassmann Joan E. The life cycles of Dictyostelium discoideum. <http://dictybase.org/Multimedia/DdLifeCycles/index.html>. Accessed 06 Dec 2018
28. Pan P., Hall E. M., Bonner J. T. (1975) Determination of the active portion of the folic acid molecule in cellular slime mold chemotaxis. *Journal of bacteriology* 122(1): 185–191
29. Pan M., Xu X., Chen Y., Jin T. (2016) Identification of a Chemoattractant G-Protein-Coupled Receptor for Folic Acid that Controls Both Chemotaxis and Phagocytosis. *Developmental Cell* 36(4): 428–439. doi: 10.1016/j.devcel.2016.01.012

30. Pan M., Neilson M. P., Grunfeld A. M., Cruz P., Wen X., Insall R. H., Jin T. (2018) A G-protein-coupled chemoattractant receptor recognizes lipopolysaccharide for bacterial phagocytosis. *PLoS biology* 16(5): e2005754. doi: 10.1371/journal.pbio.2005754
31. Brock D. A., Gomer R. H. (1999) A cell-counting factor regulating structure size in *Dictyostelium*. *Genes & development* 13(15): 1960–1969
32. Klein P. S., Sun T. J., Saxe C. L., Kimmel A. R., Johnson R. L., Devreotes P. N. (1988) A chemoattractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*. *Science (New York, N.Y.)* 241(4872): 1467–1472
33. Loomis W. F. (2015) Genetic control of morphogenesis in *Dictyostelium*. *Developmental Biology* 402(2): 146–161. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.03.016
34. Miranda E. R., Nam E. A., Kuspa A., Shaulsky G. (2015) The ABC transporter, AbcB3, mediates cAMP export in *D. discoideum* development. *Developmental Biology* 397(2): 203–211. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.11.006
35. Manahan C. L., Iglesias P. A., Long Y., Devreotes P. N. (2004) Chemoattractant signaling in *dictyostelium discoideum*. *Annual review of cell and developmental biology* 20: 223–253. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.011303.132633
36. Schwebs D. J., Pan M., Adhikari N., Kuburich N. A., Jin T., Hadwiger J. A. (2018) *Dictyostelium* Erk2 is an atypical MAPK required for chemotaxis. *Cellular signalling* 46: 154–165. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.03.006
37. Bonner J. T., Barkley D. S., Hall E. M., Konijn T. M., Mason J. W., O'Keefe G., Wolfe P. B. (1969) Acrasin, Acrasinase, and the sensitivity to acrasin in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology* 20(1): 72–87
38. Sugang R., Weijer C. J., Siegert F., Franke J., Kessin R. H. (1997) Null mutations of the *Dictyostelium* cyclic nucleotide phosphodiesterase gene block chemotactic cell movement in developing aggregates. *Developmental Biology* 192(1): 181–192. doi: 10.1006/dbio.1997.8720
39. Tweedy L., Knecht D. A., Mackay G. M., Insall R. H. (2016) Self-Generated Chemoattractant Gradients: Attractant Depletion Extends the Range and Robustness of Chemotaxis. *PLoS biology* 14(3): e1002404. doi: 10.1371/journal.pbio.1002404
40. Tweedy L., Susanto O., Insall R. H. (2016) Self-generated chemotactic gradients-cells steering themselves. *Current opinion in cell biology* 42: 46–51. doi: 10.1016/j.ceb.2016.04.003
41. Romeralo M., Skiba A., Gonzalez-Voyer A., Schilde C., Lawal H., Kedziora S., Cavender J. C., Glockner G., Urushihara H., Schaap P. (2013) Analysis of phenotypic evolution in *Dictyostelia* highlights developmental plasticity as a likely consequence of colonial multicellularity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280(1764): 20130976. doi: 10.1098/rspb.2013.0976
42. De Wit, R J, Konijn T. M. (1983) Identification of the acrasin of *Dictyostelium minutum* as a derivative of folic acid. *Cell differentiation* 12(4): 205–210
43. Van Haastert, P J, De Wit, R J, Grijpma Y., Konijn T. M. (1982) Identification of a pterin as the acrasin of the cellular slime mold *Dictyostelium lacteum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(20): 6270–6274

44. Wurster B., Pan P., Tyan G. G., Bonner J. T. (1976) Preliminary characterization of the acrasin of the cellular slime mold *Polysphondylium violaceum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(3): 795–799
45. Shimomura O., Suthers H. L., Bonner J. T. (1982) Chemical identity of the acrasin of the cellular slime mold *Polysphondylium violaceum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(23): 7376–7379
46. Asghar A., Groth M., Siol O., Gaube F., Enzensperger C., Glöckner G., Winckler T. (2012) Developmental Gene Regulation by an Ancient Intercellular Communication System in Social Amoebae. *Protist* 163(1): 25–37. doi: 10.1016/j.protis.2010.12.002
47. Waddell D. R. (1982) A predatory slime mould. *Nature* 298(5873): 464–466. doi: 10.1038/298464a0
48. De Wit, R J, van Bemmelen, M X, Penning L. C., Pinas J. E., Calandra T. D., Bonner J. T. (1988) Studies of cell-surface glorin receptors, glorin degradation, and glorin-induced cellular responses during development of *Polysphondylium violaceum*. *Experimental cell research* 179(2): 332–343
49. Jones M. E. (1976) Aggregation in *Polysphondylium*. *Journal of cell science* 22(1): 35–40
50. Kopachik W. (1990) Glorin-regulated protein synthesis in *Polysphondylium violaceum*. *Experimental cell research* 186(2): 394–397
51. Asghar A. (2012) Developmental gene regulation by an ancient intercellular communication system in social amoebae. Promotion, Friedrich-Schiller-Universität Jena
52. Lee Y.-S., Lee S.-W., Park Woon-Jong (1987) An Efficient Route for the Synthesis of Glorin. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 8(1): 58–59
53. Ball J. B., Craik D. J., Alewood P. F., Morrison S., Andrews P. R., Nicholls I. A. (1989) Synthesis and Conformational Analysis of the Slime-Mold Acrasin Glorin. *Aust. J. Chem.* 42(12): 2171. doi: 10.1071/CH9892171
54. Barnett R., Raszkowski D., Winckler T., Stallforth P. (2017) Versatile synthesis of the signaling peptide glorin. *Beilstein J. Org. Chem.* 13: 247–250. doi: 10.3762/bjoc.13.27
55. Bozzaro S. (2013) The Model Organism *Dictyostelium discoideum*. In: Eichinger L, Rivero F (eds) *Dictyostelium discoideum* Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, pp 17–37
56. dictyBase. <http://dictybase.org/>
57. NCBI GenBank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (17.05.2019)
58. NCBI Blastp: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> (17.05.2019)

59. Eichinger L., Pachebat J. A., Glöckner G., Rajandream M.-A., Sucgang R., Berriman M., Song J., Olsen R., Szafranski K., Xu Q., Tunggal B., Kummerfeld S., Madera M., Konfortov B. A., Rivero F., Bankier A. T., Lehmann R., Hamlin N., Davies R., Gaudet P., Fey P., Pilcher K., Chen G., Saunders D., Sodergren E., Davis P., Kerhornou A., Nie X., Hall N., Anjard C., Hemphill L., Bason N., Farbrother P., Desany B., Just E., Morio T., Rost R., Churcher C., Cooper J., Haydock S., van Driessche N., Cronin A., Goodhead I., Muzny D., Mourier T., Pain A., Lu M., Harper D., Lindsay R., Hauser H., James K., Quiles M., Madan Babu M., Saito T., Buchrieser C., Wardroper A., Felder M., Thangavelu M., Johnson D., Knights A., Louseged H., Mungall K., Oliver K., Price C., Quail M. A., Urushihara H., Hernandez J., Rabbinoiwitsch E., Steffen D., Sanders M., Ma J., Kohara Y., Sharp S., Simmonds M., Spiegler S., Tivey A., Sugano S., White B., Walker D., Woodward J., Winckler T., Tanaka Y., Shaulsky G., Schleicher M., Weinstock G., Rosenthal A., Cox E. C., Chisholm R. L., Gibbs R., Loomis W. F., Platzer M., Kay R. R., Williams J., Dear P. H., Noegel A. A., Barrell B., Kuspa A. (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435(7038): 43–57. doi: 10.1038/nature03481
60. Sucgang R., Kuo A., Tian X., Salerno W., Parikh A., Feasley C. L., Dalin E., Tu H., Huang E., Barry K., Lindquist E., Shapiro H., Bruce D., Schmutz J., Salamov A., Fey P., Gaudet P., Anjard C., Babu M. M., Basu S., Bushmanova Y., van der Wel, Hanke, Katoh-Kurasawa M., Dinh C., Coutinho P. M., Saito T., Elias M., Schaap P., Kay R. R., Henrissat B., Eichinger L., Rivero F., Putnam N. H., West C. M., Loomis W. F., Chisholm R. L., Shaulsky G., Strassmann J. E., Queller D. C., Kuspa A., Grigoriev I. V. (2011) Comparative genomics of the social amoebae *Dictyostelium discoideum* and *Dictyostelium purpureum*. *Genome biology* 12(2): R20. doi: 10.1186/gb-2011-12-2-r20
61. Urushihara H., Kuwayama H., Fukuhara K., Itoh T., Kagoshima H., Shin-I T., Toyoda A., Ohishi K., Taniguchi T., Noguchi H., Kuroki Y., Hata T., Uchi K., Mohri K., King J. S., Insall R. H., Kohara Y., Fujiyama A. (2015) Comparative genome and transcriptome analyses of the social amoeba *Acytostelium subglobosum* that accomplishes multicellular development without germ-soma differentiation. *BMC genomics* 16: 80. doi: 10.1186/s12864-015-1278-x
62. Singh R., Lawal H. M., Schilde C., Glöckner G., Barton G. J., Schaap P., Cole C. (2017) Improved annotation with de novo transcriptome assembly in four social amoeba species. *BMC genomics* 18(1): 120. doi: 10.1186/s12864-017-3505-0
63. Dunn J. D., Bosmani C., Barisch C., Raykov L., Lefrançois L. H., Cardenal-Muñoz E., López-Jiménez A. T., Soldati T. (2017) Eat Prey, Live: *Dictyostelium discoideum* As a Model for Cell-Autonomous Defenses. *Frontiers in immunology* 8: 1906. doi: 10.3389/fimmu.2017.01906
64. Carnell M. J., Insall R. H. (2011) Actin on disease--studying the pathobiology of cell motility using *Dictyostelium discoideum*. *Seminars in cell & developmental biology* 22(1): 82–88. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.12.003
65. Devreotes P., Horwitz A. R. (2015) Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7(8): a005959. doi: 10.1101/cshperspect.a005959
66. Muñoz-Braceras S., Calvo R., Escalante R. (2015) TipC and the chorea-acanthocytosis protein VPS13A regulate autophagy in *Dictyostelium* and human HeLa cells. *Autophagy* 11(6): 918–927. doi: 10.1080/15548627.2015.1034413

67. Warren E. C., Walker M. C., Williams, Robin S B (2018) All You Need Is Fats-for Seizure Control: Using Amoeba to Advance Epilepsy Research. *Frontiers in cellular neuroscience* 12: 199. doi: 10.3389/fncel.2018.00199
68. Klapper M., Götze S., Barnett R., Willing K., Stallforth P. (2016) Bacterial Alkaloids Prevent Amoebal Predation. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55(31): 8944–8947. doi: 10.1002/anie.201603312
69. Arp J., Götze S., Mukherji R., Mattern D. J., García-Altres M., Klapper M., Brock D. A., Brakhage A. A., Strassmann J. E., Queller D. C., Bardl B., Willing K., Peschel G., Stallforth P. (2018) Synergistic activity of cosecreted natural products from amoebae-associated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(15): 3758–3763. doi: 10.1073/pnas.1721790115
70. Barnett R., Stallforth P. (2018) Natural Products from Social Amoebae. *Chem. Eur. J.* 24(17): 4202–4214. doi: 10.1002/chem.201703694
71. Otto G. P., Cocorocchio M., Munoz L., Tyson R. A., Bretschneider T., Williams, Robin S B (2016) Employing Dictyostelium as an Advantageous 3Rs Model for Pharmacogenetic Research. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1407: 123–130. doi: 10.1007/978-1-4939-3480-5\_9
72. Corpet F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research* 16(22): 10881–10890
73. Senear D. F., Teller D. C. (1981) Thermodynamics of concanavalin A dimer-tetramer self-association: sedimentation equilibrium studies. *Biochemistry* 20(11): 3076–3083
74. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* 68(5): 850–858
75. Muinonen-Martin A. J., Veltman D. M., Kalna G., Insall R. H., Gullberg D. (2010) An Improved Chamber for Direct Visualisation of Chemotaxis. *PloS one* 5(12): e15309. doi: 10.1371/journal.pone.0015309
76. Pfaffl M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29(9): e45
77. Orłowski M., Meister A. (1963) Gamma-glutamyl-p-nitroanilide: A new convenient substrate for determination and study of L- and D-gamma-glutamyltranspeptidase activities. *Biochimica et biophysica acta* 73: 679–681
78. Roberts H. M., Ling M. R., Insall R., Kalna G., Spengler J., Grant M. M., Chapple, Iain L C (2015) Impaired neutrophil directional chemotactic accuracy in chronic periodontitis patients. *Journal of clinical periodontology* 42(1): 1–11. doi: 10.1111/jcpe.12326
79. Ollis D. L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S. M., Harel M., Remington S. J., Silman I., Schrag J., Sussman J. L., Verschueren K. H., Goldman A. (1992) The  $\alpha$  /  $\beta$  hydrolase fold. *Protein Eng Des Sel* 5(3): 197–211. doi: 10.1093/protein/5.3.197
80. Jeske L., Placzek S., Schomburg I., Chang A., Schomburg D. (2019) BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource. *Nucleic acids research* 47(D1): D542. doi: 10.1093/nar/gky1048

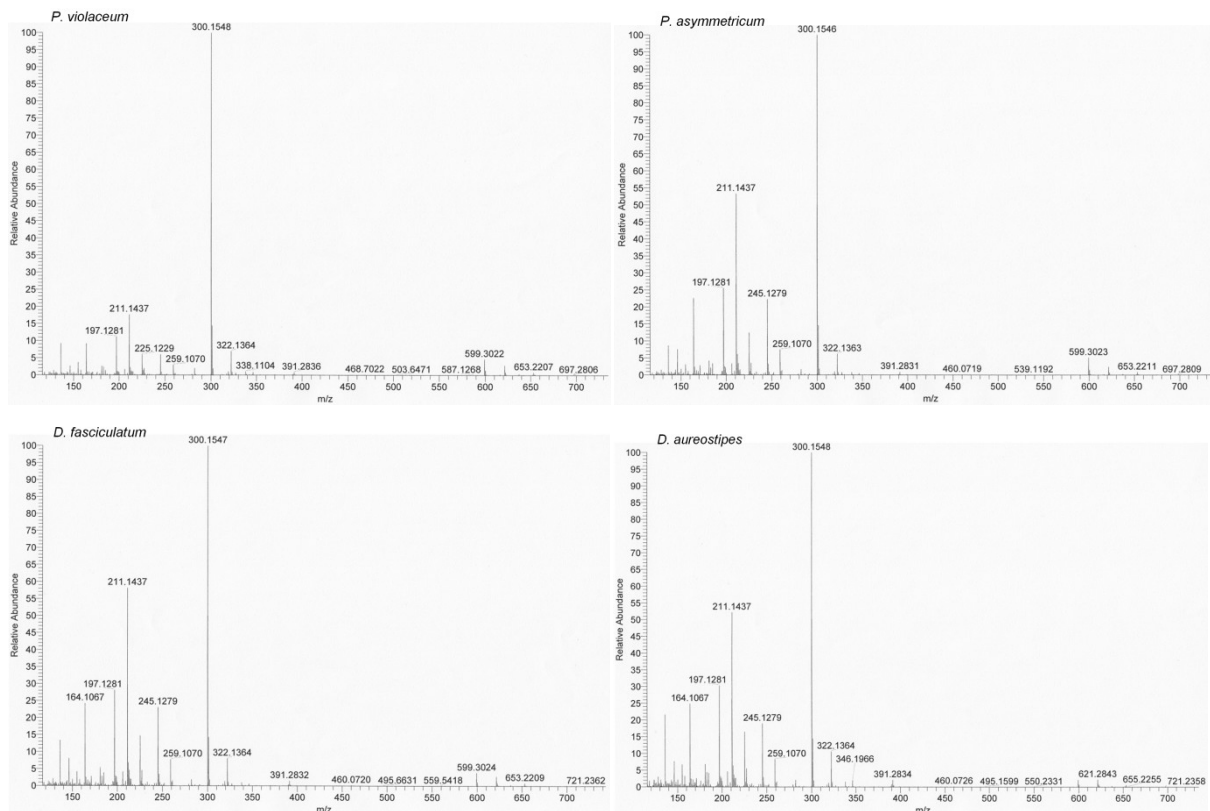
81. Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25(17): 3389–3402
82. Marchler-Bauer A., Bo Y., Han L., He J., Lanczycki C. J., Lu S., Chitsaz F., Derbyshire M. K., Geer R. C., Gonzales N. R., Gwadz M., Hurwitz D. I., Lu F., Marchler G. H., Song J. S., Thanki N., Wang Z., Yamashita R. A., Zhang D., Zheng C., Geer L. Y., Bryant S. H. (2017) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic acids research* 45(D1): D200–D203. doi: 10.1093/nar/gkw1129
83. Goldstein I. J., Hollerman C. E., Smith E. E. (1965) Protein-Carbohydrate Interaction. II. Inhibition Studies on the Interaction of Concanavalin A with Polysaccharides \*. *Biochemistry* 4(5): 876–883. doi: 10.1021/bi00881a013
84. Petersen T. N., Brunak S., Heijne G. von, Nielsen H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* 8(10): 785–786. doi: 10.1038/nmeth.1701
85. Williams K. L., Emslie K. R., Slade M. B. (1995) Recombinant glycoprotein production in the slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Current opinion in biotechnology* 6(5): 538–542
86. Fernández F. J., Vega M. C. (2013) Technologies to keep an eye on: alternative hosts for protein production in structural biology. *Current Opinion in Structural Biology* 23(3): 365–373. doi: 10.1016/j.sbi.2013.02.002
87. Lieberman M. W., Barrios R., Carter B. Z., Habib G. M., Lebovitz R. M., Rajagopalan S., Sepulveda A. R., Shi Z.-Z., Wan D.-F. (1995)  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase. *American Journal of Pathology* 147(5)
88. Duckwitz N. (2017) Biosynthese des chemotaktisch aktiven Glorin der sozialen Amöbe *Polysphondylium pallidum*, Friedrich-Schiller-Universität Jena
89. Verma V. V., Gupta R., Goel M. (2015) “Phylogenetic and evolutionary analysis of functional divergence among Gamma glutamyl transpeptidase (GGT) subfamilies”. *Biol Direct* 10(1): 357. doi: 10.1186/s13062-015-0080-7
90. Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)* 23(21): 2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404
91. Castellano I., Merlino A. (2012)  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidases: sequence, structure, biochemical properties, and biotechnological applications. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69(20): 3381–3394. doi: 10.1007/s00018-012-0988-3
92. Fey P., Kowal A. S., Gaudet P., Pilcher K. E., Chisholm R. L. (2007) Protocols for growth and development of *Dictyostelium discoideum*. *Nature Protocols* 2: 1307 EP -
93. Garratt P. J. (1993) UV-vis atlas of organic compounds. By H.-H. Perkampus. 2nd Ed., VCH, Weinheim 1992, 336 pp. + 1525 pp., hardback, DM 750, ISBN 3-527-28510-5. *Adv. Mater.* 5(10): 770. doi: 10.1002/adma.19930051024

94. Schwaneberg U., Schmidt-Dannert C., Schmitt J., Schmid R. D. (1999) A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A. *Analytical biochemistry* 269(2): 359–366. doi: 10.1006/abio.1999.4047
95. Chipinda I., Ajibola R. O., Morakinyo M. K., Ruwona T. B., Simoyi R. H., Siegel P. D. (2010) Rapid and simple kinetics screening assay for electrophilic dermal sensitizers using nitrobenzenethiol. *Chemical research in toxicology* 23(5): 918–925. doi: 10.1021/tx100003w
96. Iranfar N., Fuller D., Loomis W. F. (2003) Genome-wide expression analyses of gene regulation during early development of *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryotic cell* 2(4): 664–670
97. Iranfar N., Fuller D., Loomis W. F. (2006) Transcriptional regulation of post-aggregation genes in *Dictyostelium* by a feed-forward loop involving GBF and LagC. *Developmental Biology* 290(2): 460–469. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.11.035
98. Zou L.-W., Jin Q., Wang D.-D., Qian Q.-K., Hao D.-C., Ge G.-B., Yang L. (2018) Carboxylesterase Inhibitors: An Update. *CMC* 25(14): 1627–1649. doi: 10.2174/0929867325666171204155558
99. Hatfield M. J., Umans R. A., Hyatt J. L., Edwards C. C., Wierdl M., Tsurkan L., Taylor M. R., Potter P. M. (2016) Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. *Chemico-Biological Interactions* 259: 327–331. doi: 10.1016/j.cbi.2016.02.011
100. Bakthavatsalam D., Brock D. A., Nikravan N. N., Houston K. D., Hatton R. D., Gomer R. H. (2008) The secreted *Dictyostelium* protein CfaD is a chalone. *Journal of cell science* 121(15): 2473–2480. doi: 10.1242/jcs.026682
101. Franke J., Kessin R. H. (1992) The cyclic nucleotide phosphodiesterases of *Dictyostelium discoideum*: Molecular genetics and biochemistry. *Cellular signalling* 4(5): 471–478. doi: 10.1016/0898-6568(92)90016-2
102. Feasley C. L., van der Wel, Hanke, West C. M. (2015) Evolutionary diversity of social amoebae N-glycomes may support interspecific autonomy. *Glycoconj J* 32(6): 345–359. doi: 10.1007/s10719-015-9592-8
103. Kawabe Y., Morio T., Tanaka Y., Schaap P. (2018) Glycogen synthase kinase 3 promotes multicellular development over unicellular encystation in encysting *Dictyostelia*. *EvoDevo* 9(1): 450. doi: 10.1186/s13227-018-0101-6
104. Kawabe Y., Enomoto T., Morio T., Urushihara H., Tanaka Y. (1999) LbrA, a protein predicted to have a role in vesicle trafficking, is necessary for normal morphogenesis in *Polysphondylium pallidum*. *Gene* 239(1): 75–79. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00379-0
105. Pica A., Chi M.-C., Chen Y.-Y., d'Ischia M., Lin L.-L., Merlino A. (2016) The maturation mechanism of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidases: Insights from the crystal structure of a precursor mimic of the enzyme from *Bacillus licheniformis* and from site-directed mutagenesis studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1864(2): 195–203. doi: 10.1016/j.bbapap.2015.10.006
106. Maines M. D., Costa L. G., Hodgson E., Reed D. J., Sipes I. G., Ikeda Y., Taniguchi N. (2001) *Current Protocols in Toxicology* 79: 1088. doi: 10.1002/0471140856.tx0606s05



107. Schmidt-Dannert C., Arnold F. H. (1999) Directed evolution of industrial enzymes. *Trends in Biotechnology* 17(4): 135–136. doi: 10.1016/S0167-7799(98)01283-9
108. Kim B.-J., Choi C.-H., Lee C.-H., Jeong S.-Y., Kim J.-S., Kim B.-Y., Yim H.-S., Kang S.-O. (2005) Glutathione is required for growth and prespore cell differentiation in *Dictyostelium*. *Developmental Biology* 284(2): 387–398. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.05.034
109. Kim J.-S., Seo J.-H., Kang S.-O. (2014) Glutathione initiates the development of *Dictyostelium discoideum* through the regulation of YakA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843(3): 664–674. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.014
110. Lee H.-M., Kim J.-S., Kang S.-O. (2016) Glutathione upregulates cAMP signalling via G protein alpha 2 during the development of *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett* 590(23): 4361–4371. doi: 10.1002/1873-3468.12453
111. Du Q., Kawabe Y., Schilde C., Chen Z.-h., Schaap P. (2015) The Evolution of Aggregative Multicellularity and Cell–Cell Communication in the Dictyostelia. *Journal of Molecular Biology* 427(23): 3722–3733. doi: 10.1016/j.jmb.2015.08.008
112. Rodriguez-Centeno J., Sastre L. (2016) Biological Activity of the Alternative Promoters of the *Dictyostelium discoideum* Adenylyl Cyclase A Gene. *PloS one* 11(2): e0148533. doi: 10.1371/journal.pone.0148533
113. Timmis J. N., Ayliffe M. A., Huang C. Y., Martin W. (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews Genetics* 5(2): 123–135. doi: 10.1038/nrg1271
114. Zimmer C. (2009) On the Origin of Eukaryotes. *Science* 325(5941): 666–668. doi: 10.1126/science.325\_666
115. Soucy S. M., Huang J., Gogarten J. P. (2015) Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature reviews. Genetics* 16(8): 472–482. doi: 10.1038/nrg3962
116. Doolittle W. F. (1998) You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends in genetics : TIG* 14(8): 307–311
117. Glöckner G., Lawal H. M., Felder M., Singh R., Singer G., Weijer C. J., Schaap P. (2016) The multicellularity genes of dictyostelid social amoebas. *Nature Communications* 7: 12085 EP -
118. Alsmark C., Foster P. G., Sicheritz-Ponten T., Nakjang S., Martin Embley T., Hirt R. P. (2013) Patterns of prokaryotic lateral gene transfers affecting parasitic microbial eukaryotes. *Genome biology* 14(2): R19. doi: 10.1186/gb-2013-14-2-r19

## Anhang



**Anhang 1: Massenspektren des Metaboliten M1 der Umsetzung von Glorin durch *P. violaceum*, *P. asymmetricum*, *D. fasciculatum* und *D. aureostipes***

>PPA\_G1286130

MFLKLISVLLIVSLAYVANGQQSAPLTVSARSGVFTGIYFNSTRAFLGVVPYAKPPVGSRLRFEQPQ  
 PRDYIFGTYQATTHAPSCWQSGKPAGYVYSEDCLYMDIYTPKGYSRNSMPVLVFIHGGRYWTG  
 AATDFPGDKLAAIQKAVVVIIQYRLNVFGFQPFSDSNNNLGLQDQQLALRFVRDNIRAFGGDPS  
 QVTIFGESAGGSSVLHHTIIPSSFSLYNNAIIQSAWQWYIPTVAQGRTKMASWAATKGCDGTTD  
 IITCLKTKNATDITPTAGQSDFFVPMVDGKLITSLPLKAIKEKRYNYDATIMMGHNYDEGNFMA  
 YSRLGWVPPNVTVTDATYNTSIAKYLN VFYFNSSQVTDIMNLYAPVAAQLGNWYGGAEFFGDY  
 YIVCGSILASQYFKADRVEAYYYLFNYSSPNYPANWF LAASHGNELPYIFFQDIYTPYPFANS  
 NLLASRMSSAWVDFADNDSPRSPLSDWPTNYPQAMYYGPNASDFKATKPYTKDICENWRQY  
 FEAY

**Anhang 2: Proteinsequenz des Glorinasekandidaten PPA\_G1286130 (PPL\_01946) aus *P. pallidum***

>PPA\_G1374042

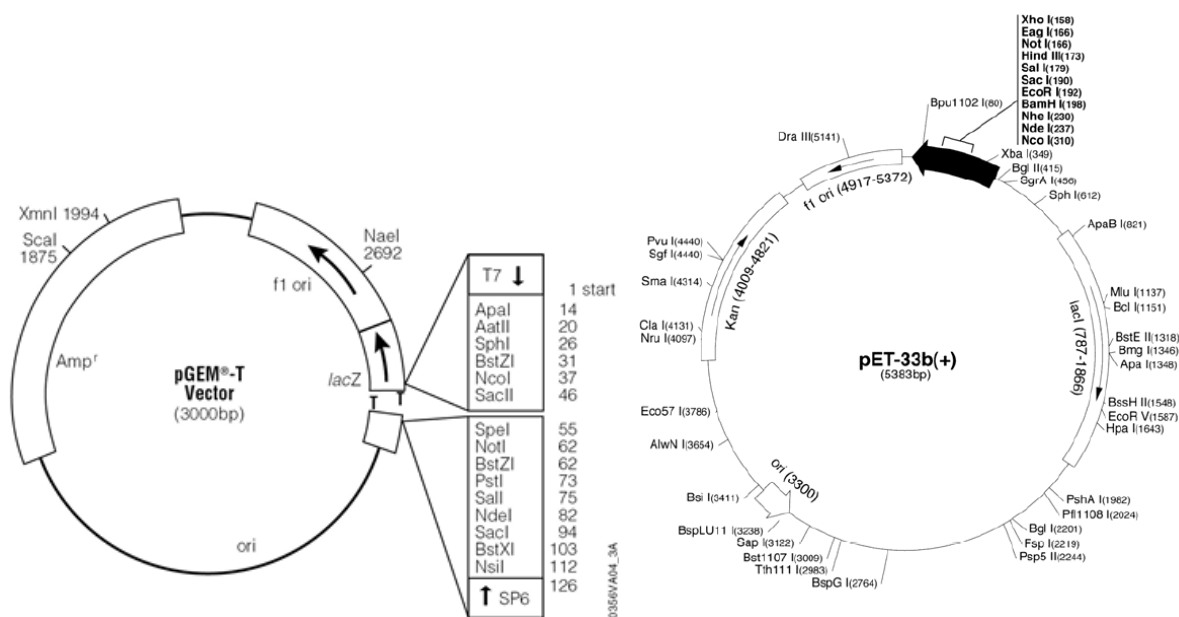
MRIFYLATIILLSGLLANAQFDGQSSWGSPSNTYPLTVNSRSGMYTGIYMNESRAFLGIPYAQPP  
TGNLRFKPPQSLWYNWGMTYATQMPPSCWQSGKPTGYIMSEDCLYLNVTTPKNIHNVNPTQ  
YYSNLPVMVFLHGGRYWTGAATDFQGDHLAAVGNVIHVVIQYRLNIFGFQSFQSDGNTNIGLQDQ  
QMALRWVQDNIRSFGGDPERVTIYGESAGGSATLYHLTMPSSYNLYNRIVAHSAWQWVPT  
AATSKVKTAAYAATKGCANVTSSGAPDYNAILRCMQSKPAADITPTVGNSDFFVPMVDGNLIK  
TQLLTAFKQKGKYNKRANIIIGHNYDEGHYMAFARLGYVPPTTTVTNTTLYNSLVKYLNVYFTP  
AQRDEIISWYLPVAGEIGNWMGGSEFFGDYYINCGSIMASEYLFQQGVKFNNYIFNYSSPNYPSS  
DWFLAASHGNELPYVFFQDVYTPYPFAPADAVLAHRMTRSWTDYADNGNPSGPFPSRWPT  
YPDAMYYGPDVMNYNDKRPYSKAICENWRQYLEAY

Anhang 3: Proteinsequenz des Glorinasekandidaten PPA\_G1374042 (PPL\_11291) aus *P. pallidum*

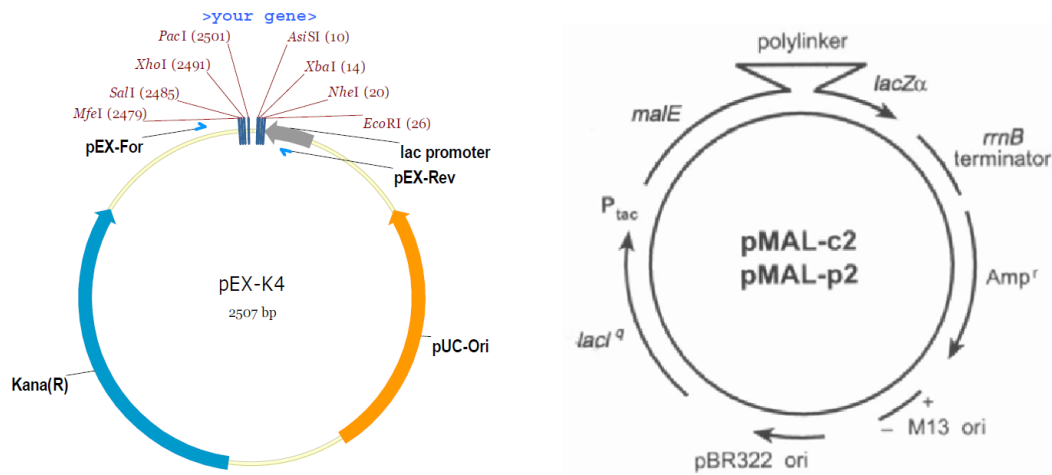
>PPA\_G1318746

MNFLYNYDNRSPVISINGICGSSQPLASQVGIDILKSGGNAADA AVAMAATLNITQPCSTGIGGD  
CFVLYYNNITKKVSGINGSGRAPSKLTLDLIRERINGNSIPFDSPLAITVPGAAAGWCDTVEHF  
GSGKLSFQQILQPAIDYCEQGVPIHIITSQDWNANAYQLERSENAGELKIDGKAPVVGDIKFNPT  
LANTFRLAKHGKDGFKGSVADAIKVINNLGGVMTHSDLENHTSTLDTPISVNYRGYNVYE  
MPPNGQGLTVLLALRILEGFDLSKLDPLSDQHTHLLIEALRLSFADTRYVADPEFSKVPIEELL  
SKEYAESRRSLINEYHSNRTIDKGYPTNGSNTVYLSVADKDGNAACSFINSNYTGFSGIIPKGC GF  
TLHNRGANFVLDETHPNCLKPNKRPYHTIIPSMITDKYGELYASFGVMGKFIQPQAQVQTIVNL  
IDHKMDPQAALSHPRFMIDGGDHPSEVYFEPEFANILESLKRGHNIGLEPAHRHIFGNGQVIV  
SKLNNQNQRILIAGSDNRCDGVAISY

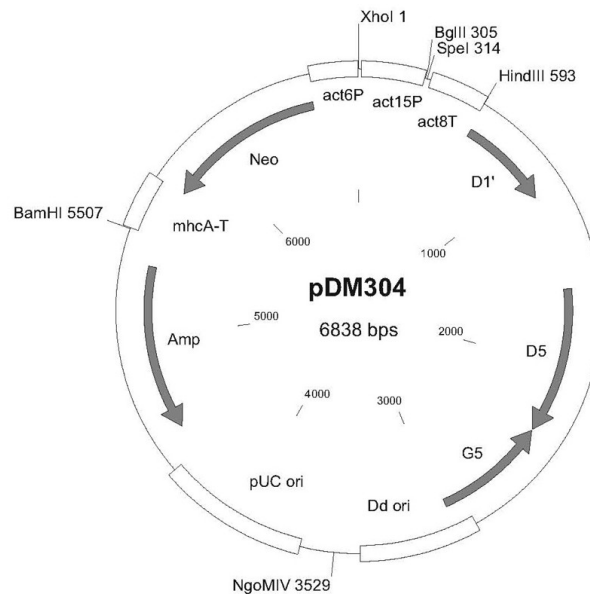
Anhang 4: Proteinsequenz der  $\gamma$ GT PPA\_G1318746 (PPL\_06821) aus *P. pallidum*



Anhang 5: Vektorkarten des Klonierungsvektors pGEM-T zur Vermehrung von Genen und des Expressionsvektors pET33b(+) zur Expression von Genen in *E. coli*



Anhang 6: Vektorkarten des Transportvektors pEX-K4 für synthetisierte Gene und des Expressionsvektors pMAL-c2 und -p2 zur Fusionierung und Expression von MBP an ein Protein. c2 ohne Signalsequenz in *malE*, p2 mit Signalsequenz in *malE*



Anhang 7: Vektorkarte des Expressionsvektors pDM304 zur Expression von Genen in *D. discoideum* oder *P. pallidum*

## Liste der wissenschaftlichen Publikationen

### Originalarbeiten

2018

**D. Heinrich**, R. Barnett, L. Tweedy, R. Insall, P. Stallforth & **T. Winckler** (2018). The chemoattractant glorin is inactivated by ester cleavage during early multicellular development of *Polysphondylium pallidum*. ACS Chemical Biology 13, 1506-1513

doi: 10.1021/acscchembio.8b00046

2017

R. Barnett, **D. Raszkowski**, **T. Winckler** & P. Stallforth (2017). Versatile synthesis of the signaling peptide glorin. Beilstein Journal of Organic Chemistry 13, 247-250.

doi: 10.3762/bjoc.13.27

2016

S. Schulz, D. Schuhmacher, **D. Raszkowski**, M. Girhard, V. B. Urlacher (2016). Fusion to hydrophobin HFBI improves the catalytic performance of a cytochrome P450 system. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 4(57)

doi: 10.3389/fbioe.2016.00057

### Präsentationen Vortrag

**D. Raszkowski**, L. Tweedy, R. Insall & T. Winckler (2016) Metabolism of the signaling molecule glorin during multicellular development of *Polysphondylium* species. Symposium der Jena School for Microbial Communication JSMC in Jena.

### Präsentationen Poster

**D. Raszkowski**, D. Hoffmeister, T. Winckler (2014) Glorin-based intercellular communication during multicellular development of *Polysphondylium pallidum*. Symposium der Jena School for Microbial Communication JSMC in Jena.

**D. Raszkowski**, D. Hoffmeister, T. Winckler (2015) Glorin-based intercellular communication during multicellular development of *Polysphondylium*. (2015) Fünfte Internationale Studentenkonzferenz zur mikrobiellen Kommunikation MiCom in Jena.

**D. Raszkowski**, D. Hoffmeister, T. Winckler (2015) Metabolism of the signaling molecule glorin during multicellular development of *Polysphondylium* species. Dictyostelium-Konferenz Dicty an der Royal Holloway Universität von London.

**D. Raszkowski**, D. Hoffmeister, T. Winckler (2015) Metabolism of the signaling molecule glorin during multicellular development of *Polysphondylium* species. Retreat der Jena School for Microbial Communication JSMC in Jena.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass mir die geltende Promotionsordnung vom 4. Dezember 2012 der Fakultät für Biowissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- dass ich die Dissertation selbstständig verfasst, keine Textabschnitte eines Dritten oder eigene Prüfungsleistungen ohne Kennzeichnung übernommen und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen angegeben habe,
- dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,
- dass ich die Dissertation weder komplett noch in Form einer in wesentlichen Teilen ähnlichen oder anderen Abhandlung einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort,Datum

Unterschrift

Daniel Heinrich

## Danksagung

Im Laufe meiner Promotion wurde ich von vielen Personen unterstützt, diesen möchte hier danken.

Als erstes Danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Winckler für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, des Laborarbeitsplatzes, für die immer offene Tür bei schwierigen Fragestellungen und für die sehr gute Betreuung auch während der Ausarbeitung dieser Dissertation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel und Herrn Dr. Pierre Stallforth für die Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation.

Der Jena School for Microbial Communication (JSMC) danke ich für die Aufnahme in ihre Graduiertenakademie und damit die Finanzierung meines Promotionsprojektes. Die JSMC ist ein lebendiges Netzwerk aus motivierten Naturwissenschaftlern.

Prof. Dr. Dirk Hoffmeister und seinem Team danke ich für den immer möglichen Zugang zur HPLC und die gute Kommunikation.

Robert Barnett und Dr. Pierre Stallforth danke ich für die gute Zusammenarbeit, für die vielen synthetisierten Glorinderivate und die hilfreichen Tipps um diese zu lösen.

Prasad Aiyar danke ich für die sehr hilfreichen Erklärungen bei der Handhabung der sozialen Amöben. Deine Ratschläge haben mir viele Fehlschläge erspart.

Frau Andrea Perner danke ich für die immer zeitnah durchgeführten Messungen zu Bestimmung der hochaufgelösten Masse.

Dr. Bernhardt Schlott, Anita Willitzer, Till Kindel und Dr. Olaf Kniemeyer, Daniel Abegg und Alexander Adibekian Ph.D. danke ich für die durchgeführten proteomischen Analysen.

Luke Tweedy und Professor Robert Insall danke für die Möglichkeit in deren Laborräumen die Chemotaxis von *P. pallidum* in der Insall-Chamber zu studieren.

Ich möchte auch meinen Institutskollegen danken, durch euch wurden die manchmal harten Forschertage erträglich. Ich fand unsere Weihnachtswanderungen vor und nach der Weihnachtsfeier immer sehr schön. Durch euch habe ich viele neue Pflanzen kennengelernt. Ich erinnere mich gerne zurück an die Jagd nach der Bella Donna oder die Suche nach der Biene und Fliege.